



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento di Scienze Chirurgiche,
Odontostomatologiche e Materno-Infantili

Scuola di Dottorato in Scienze della Vita e della Salute

Corso di Dottorato in Scienze Cardiovascolari

XXXI° CICLO / ANNO 2015

TRATTAMENTI NEUROPROTETTIVI SU DANNO DA ISCHEMIA/RIPERFUSIONE IN MODELLI SPERIMENTALI DI ARRESTO CARDIACO ED EXTRA CORPOREAL LIFE SUPPORT

S.S.D. MED/11 MALATTIE DELL'APPARATO CARDIOVASCOLARE

Coordinatore

Ch.mo Prof. GIOVANNI BATTISTA LUCIANI

Tutor

Ch.mo Prof. GIOVANNI BATTISTA LUCIANI
Ch.mo Prof. GIUSEPPE FAGGIAN
Dott. ALESSIO RUNGATSCHER

Dottorando

LINARDI DANIELE

Quest'opera è stata rilasciata con licenza Creative Commons Attribuzione – non commerciale

Non opere derivate 3.0 Italia . Per leggere una copia della licenza visita il sito web:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/it/>



Attribuzione Devi riconoscere una menzione di paternità adeguata, fornire un link alla licenza e indicare se sono state effettuate delle modifiche. Puoi fare ciò in qualsiasi maniera ragionevole possibile, ma non con modalità tali da suggerire che il licenziante avalli te o il tuo utilizzo del materiale.



NonCommerciale Non puoi usare il materiale per scopi commerciali.



Non opere derivate —Se remixi, trasformi il materiale o ti basi su di esso, non puoi distribuire il materiale così modificato.

Trattamenti neuroprotettivi su danno da ischemia/riperfusionne in modelli sperimentali di arresto cardiaco ed extra corporeal life support

Dott. Daniele Linardi

-Tesi di Dottorato-

Verona 13 Maggio 2019

SOMMARIO:

INTRODUZIONE: La sopravvivenza dopo un arresto cardiaco è strettamente correlata a una precoce ri-perfusione e ripresa della circolazione sanguigna spontanea (ROSC). Tuttavia, la sopravvivenza dipende anche dall'instaurarsi di una serie di meccanismi fisiopatologici che caratterizzano la cosiddetta sindrome post arresto. Tra i più importanti meccanismi c'è lo sviluppo di un danno cerebrale. Nonostante l'avanzamento delle tecniche di ri-perfusione anche tramite aiuto di extracorporeal life support (ECLS) la sopravvivenza a 30 giorni dei pazienti che superano l'evento acuto arresto cardiaco è inferiore al 30%.

SCOPO: Scopo degli studi effettuati durante il Corso di Dottorato in Scienze Cardiovascolari è stato di studiare le capacità neuro protettive di diversi approcci terapeutici applicati in 3 modelli sperimentali di arresto cardiaco trattato con ECLS. I trattamenti studiati sono stati: ipotermia terapeutica, ipotermia farmacologica, infusione della soluzione ALM (Adenosina-Lidocaina-Magnesio), perfusione cerebrale selettiva anterograda (SCP) durante arresto di circolo, infusione di Ossido Nitrico gassoso (NO), e riscaldamento lento dopo ipotermia accidentale.

MATERIALI E METODI: Tutti gli esperimenti si sono svolti su ratti di sesso maschile, del ceppo Sprague Dawley, del peso di circa 500 g nelle strutture del CIRSAL (Centro Interdipartimentale di Servizio alla Ricerca Sperimentale) presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia di Verona.

In particolare, sono stati ideati, realizzati ed utilizzati 3 modelli sperimentali di arresto cardiaco e ri-perfusione con circuito miniaturizzato di Circolazione Extra Corporea (CPB): Modello di arresto cardiaco sottoposto ad ECLS, modello di arresto di circolo e SCP in CPB, modello di arresto cardiaco da ipotermia accidentale e riscaldamento tramite ECLS.

RISULTATI: Nel modello di arresto cardiaco sottoposto a ECLS dall'analisi western blot dei cervelli congelati si è evidenziato un ruolo protettivo, antinfiammatorio (IL-10, IL-6, MCP1, iNOS) e anti-apoptotico (RBM3) dell'ipotermia topica e dell'ipotermia farmacologica indotta con WIN55-212. Lo stesso modello di arresto è stato utilizzato sottoponendo un gruppo di ratti a trattamento con ALM: le analisi sui cervelli congelati hanno mostrato un certo grado di riduzione dell'infiammazione (IL-6, IL-10) ma senza risultati definitivi certi. Molto più efficace si è invece dimostrato il trattamento con ossido nitrico inalatorio somministrato tramite ossigenatore con riduzione della risposta infiammatoria e dell'ipossia visualizzata su preparati di cervelli in formalina con marker immunofluorescenti per microglia (Iba1) e per Tioli.

Nel modello di arresto di circolo e SCP in CPB, durante gli esperimenti è stato possibile realizzare l'obiettivo di dimostrare la validità del nuovo modello attraverso l'analisi EEG, i preparati istologici e l'analisi dei marker di biologia molecolare (Caspasi 3, RBM3, VEGF, PARP) ma non è stata dimostrata l'efficacia del trattamento con ALM infusa direttamente nel circolo cerebrale.

Nel modello di arresto cardiaco da ipotermia accidentale e riscaldamento tramite ECLS è stato possibile evidenziare l'importanza di un riscaldamento lento rispetto ad un riscaldamento veloce tramite riduzione dell'attivazione della microglia (Iba1) riduzione, evidenziato alla analisi con Risonanza Magnetica, dell'edema cerebrale e miglioramento della perfusione cerebrale a 24 ore dall'arresto e riduzione dei marker infiammatori e di stress ossidativo evidenziati all'analisi immunoistochimica (TNF α , IL-6, CCL5, ICAM1, Malondialdeide, Nitrotirosina).

CONCLUSIONI: La frequenza in questi anni nel reparto di Cardiocirurgia ha fatto crescere in me la consapevolezza dell'importanza di trovare metodi sempre migliori e più efficaci per ridurre i danni cerebrali dopo arresto cardiaco o arresto di circolo durante chirurgia dell'arco aortico.

Gli studi effettuati sui modelli sperimentali creati presso il laboratorio di ricerca cardiovascolare durante i 3 anni di Dottorato si sono evoluti portando alla creazione di modelli sperimentali sempre più realistici e complessi che riproducono ciò che avviene nella pratica clinica.

Il lavoro effettuato pone delle basi scientifiche e metodologiche per la realizzazione di nuovi ulteriori studi sviluppando con ulteriori analisi i trattamenti sperimentali già proposti e utilizzando i nostri modelli sperimentali per studi su nuovi trattamenti nel campo della cardio e neuroprotezione nel danno da ischemia e riperfusione post arresto cardiaco accidentale o cardioplegico.

ABSTRACT:

INTRODUCTION: Survival after cardiac arrest is closely related to early reperfusion and return of spontaneous blood circulation (ROSC). However, survival also depends on a series of pathophysiological mechanisms that characterize the so-called post-arrest syndrome. One of the most important negative consequence is development of brain damage. Despite the advancement of reperfusion techniques also with the help of extracorporeal life support (ECLS), the 30-day survival after acute cardiac arrest is less than 30%.

AIM OF THE STUDY: Purpose of the research realized during the Doctoral Course in Cardiovascular Sciences was to study the neuro-protective effects of different therapeutic approaches applied in 3 experimental models of cardiac arrest treated with ECLS. The treatments studied were: therapeutic hypothermia, pharmacological hypothermia, infusion of the ALM solution (Adenosine-Lidocaine-Magnesium), selective antegrade cerebral perfusion (SCP) during circulatory arrest, infusion of gaseous Nitric Oxide (NO), and slow heating after accidental hypothermia.

MATERIALS AND METHODS: All experiments were performed on male rats, Sprague Dawley, weighing about 500 g in the structures of CIRSAL (Interdepartmental Center for Experimental Research Service) at the Faculty of Medicine and Surgery of Verona.

Three experimental models of cardiac arrest and reperfusion with a miniaturized Cardio Pulmonary Bypass (CPB) circuit were designed, implemented and used: Model of cardiac arrest subjected to ECLS, model of circulatory arrest and SCP in CPB, model of cardiac arrest cause by accidental hypothermia with rewarming and reperfusion through ECLS.

RESULTS: In the model of cardiac arrest subjected to ECLS, with western blot analysis of frozen brains, was evidenced a protective, anti-inflammatory (IL-10, IL-6, MCP1, iNOS) and anti-apoptotic (RBM3) role of topical hypothermia and pharmacological hypothermia induced with WIN55-212. The same arrest model was used, and a group of rats was subjected to ALM treatment: analysis of frozen brains showed a certain degree of reduction in inflammation (IL-6, IL-10) but without definitive results. In the same experimental model, treatment with gaseous NO administered through the oxygenator of the CPB circuit, brought to reduction of inflammatory response and hypoxia as displayed on brains prepared with immunofluorescent markers for microglia (Iba1) and for Thiols.

In the CPB model of circulatory arrest and SCP, it was possible to demonstrate the validity of the new model through the EEG analysis, the histological preparations and the analysis of molecular biology markers (Caspase 3, RBM3, VEGF, PARP) but efficacy of treatment with ALM infused directly in the cerebral circulation has not been demonstrated.

In the cardiac arrest model of accidental hypothermia and rewarming by ECLS it was possible to highlight importance of a slow heating compared to a rapid heating. It was possible to find a reduction in microglia activation (Iba1), a cerebral edema reduction and cerebral perfusion improvement 24 hours after cardiac arrest in Magnetic Resonance imaging, and a reduction of inflammatory and oxidative stress marker in immunohistochemical analysis (TNF α , IL-6, CCL5, ICAM1, Malondialdehyde, Nitrotyrosine).

CONCLUSIONS: The time spent in Cardiac Surgery Department has increased my awareness of the importance of finding better and more effective methods to reduce brain damage after cardiac arrest or circulatory arrest during aortic arch surgery.

The studies carried out on the experimental models created at the Cardiovascular Research Laboratory during the 3 years of the Doctorate have evolved, leading to the creation of increasingly realistic and complex experimental models that reproduce clinical practice.

This work lays down scientific and methodological bases for realization of new further studies, developing with further analysis the experimental treatments already proposed and using our experimental models to study new treatments in the field of cardio and neuroprotection in ischemia and reperfusion damage after accidental or cardioplegic cardiac arrest.

Alla mia famiglia

A Sara

sempre con me in questo lungo viaggio

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 ARRESTO CARDIOCIRCOLATORIO	3
Post resuscitation disease	5
1.2 DANNO CEREBRALE.....	7
Fisiopatologia del danno ischemico.....	7
Istopatologia.....	9
1.3 NEUROPROTEZIONE	11
1.3.1 IPOTERMIA.....	11
Ipotermia terapeutica: cenni storici	11
Effetti dell'ipotermia	14
Complicanze dell'ipotermia	20
Tecniche e tempistiche di induzione dell'ipotermia.....	23
Applicazioni cliniche dell'ipotermia terapeutica.....	24
Ipotermia farmacologica.....	26
Tecniche di protezione cerebrale durante chirurgia dell'arco aortico	28
Ipotermia accidentale.....	34
1.3.2 ALM (Adenosina-Lidocaina-Magnesio).....	40
Adenosina	40
Lidocaina	42
Magnesio	44
Effetti di ALM	45
1.3.3 OSSIDO NITRICO (NO).....	49
Sintesi dell'Ossido Nitrico.....	49
Disaccoppiamento di cNOS.....	51
Fisiologia del rilascio di Ossido Nitrico dall'endotelio.....	52
Ossido Nitrico nell'attività cardiaca	42
NO - donors	54

Applicazioni cliniche dell'Ossido Nitrico	56
Effetti dell'Ossido Nitrico nella sindrome post arresto cardiaco	58
1.4 EXTRA CORPOREAL MEMBRANE OXIGENATION (ECMO)	59
Definizione e cenni storici	59
Componenti	59
Tecniche	60
Utilizzo dell'ECMO nell'arresto cardiaco	62
2. SCOPO DELLO STUDIO	64
3. MATERIALE E METODI	65
3.1 I 3 MODELLI DI ARRESTO CARDIACO	66
Modello di arresto cardiaco ed ECLS	66
Modello di arresto di circolo e SCP tramite CPB	68
Modello di arresto cardiaco da ipotermia accidentale e riscaldamento con ECLS ..	70
3.2 NUMEROSITA' DEI CAMPIONI	72
3.2 PRELIEVI DEI TESSUTI ED ANALISI	73
Campioni congelati	73
Western Blot	74
Real Time PCR	74
Campioni in Paraformaldeide (PFA)	75
Ematossilina - Eosina	75
Immunoistochimica	77
Immunofluorescenza	78
Elettroencefalogramma	80
Risonanza Magnetica	82
4. IPOTERMIA FARMACOLOGICA	83
4.1 SCOPO DELLO STUDIO	83
4.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO	83
4.3 RISULTATI	84

Abbassamento della temperatura	84
Lattacideemia.....	85
Biologia molecolare	85
4.4 DISCUSSIONE	89
4.5 CONCLUSIONI	91
5. ADENOSINA LIDOCAINA MAGNESIO (ALM).....	92
5.1 SCOPO DELLO STUDIO.....	92
5.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO.....	92
5.3 RISULTATI.....	93
Biologia molecolare	93
Istologia.....	97
5.4 DISCUSSIONE	98
5.5 CONCLUSIONI	101
6. OSSIDO NITRICO (NO).....	102
6.1 SCOPO DELLO STUDIO.....	102
6.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO.....	102
6.3 RISULTATI.....	105
Emogasanalisi	105
Immunofluorescenza.....	106
6.4 DISCUSSIONE	98
6.5 CONCLUSIONI	115
7. ARRESTO DI CIRCOLO E PERFUSIONE CEREBRALE SELETTIVA	116
7.1 SCOPO DELLO STUDIO.....	116
7.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO.....	118
7.3 RISULTATI.....	120
Biologia molecolare	120

EEG.....	124
Istologia.....	130
7.4 DISCUSSIONE	131
7.5 CONCLUSIONI	136
8. IPOTERMIA ACCIDENTALE	137
8.1 SCOPO DELLO STUDIO.....	137
8.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO.....	137
8.3 RISULTATI.....	139
Emogasanalisi	139
Immunoistochimica.....	140
Immunofluorescenza.....	145
Wet/dry ratio	147
Pressione di perfusione cerebrale.....	147
Risonanza Magnetica	148
8.4 DISCUSSIONE	150
8.5 CONCLUSIONI	155
9. CONCLUSIONI FINALI E CONSIDERAZIONI PERSONALI.....	156
10. BIBLIOGRAFIA	158

1. INTRODUZIONE

Durante gli anni di Specialità in Cardiocirurgia e durante il Corso di Dottorato in Scienze Cardiovascolari ho contribuito alla creazione e sviluppo di 3 principali modelli sperimentali legati all'arresto cardiaco e al danno da ischemia e riperfusione.

Tutti gli esperimenti riportati in questa tesi sono frutto di anni di ricerca effettuata nel laboratorio di ricerca cardiovascolare degli Istituti Biologici presso l'Università degli Studi di Verona diretto dal Prof. G. Faggian e affidato al responsabile della ricerca sperimentale Dott. A. Rungtatscher.

Sebbene inizialmente l'obiettivo principale dello sviluppo dei nostri modelli di ricerca fosse lo studio di modelli e farmaci al fine di indagare i fenomeni di cardio-mioprotezione si è presto reso chiaro che l'organo più danneggiato dai nostri esperimenti non era il cuore bensì l'encefalo, abbiamo così continuato a cercare di creare modelli di ischemia cardiaca ed arresto cardiaco studiando gli effetti sia a livello cardiaco che cerebrale. L'importanza della ricerca in questo campo deriva anche dalla mia esperienza clinica maturata frequentando il reparto, la sala operatoria e la terapia intensiva dell'U.O. di Cardiocirurgia dove è risultato evidente che seppure l'intervento cardiaco potesse riuscire con l'ausilio o meno di farmaci o assistenze meccaniche riuscire ad avere un cuore funzionante in presenza di un danno neurologico maggiore vanificava gli sforzi effettuati fino a quel momento, rendendo anzi molto più difficoltosa l'assistenza del paziente anche da parte dei familiari che dovranno poi sempre assistere il paziente non più autonomo a causa del danno neurologico.

Scopo della ricerca è stato quindi migliorare l'esito neurologico in presenza di un danno da ischemia e riperfusione globale causato da arresto cardiaco.

I tre modelli che verranno descritti nella sezione materiali e metodi in dettaglio sono tutti modelli di arresto cardiaco e causano un danno da ischemia e riperfusione di cuore, cervello e di tutti gli altri organi. In questa tesi vengono riportati solo i risultati che riguardano il danno neurologico e gli effetti neuro protettivi dei trattamenti effettuati.

I 3 modelli utilizzati sono:

- Modello di arresto cardiaco sottoposto ad ECLS (Extra Corporeal Life Support)
- Modello di arresto di Circolo e Perfusioni Cerebrali Selettive (SCP) in Circolazione Extra Corporea (CPB)
- Modello di arresto cardiaco da ipotermia accidentale e riscaldamento tramite ECLS

Gli esperimenti si sono spesso svolti con molte difficoltà e varie interruzioni per mancanza di adeguata collaborazione e di incapacità di reperire collaboratori pronti a produrre le analisi richieste tutti sempre con poco tempo e con altri progetti da seguire, esitando quindi in certi casi in strade chiuse con campioni già prelevati ma nessuno in grado, o con l'intenzione o il tempo, di fornire le analisi richieste.

La ricerca in questo campo ha bisogno di ulteriore sviluppo ed ulteriori analisi, cosa che permette di mantenere la volontà di fare meglio e di continuare a ricercare in questo campo e la necessità di aprire sempre di più a collaborazioni tra i vari dipartimenti di ricerca, tra le varie università e di stabilire contatti anche con ricercatori internazionali.

1.1 ARRESTO CARDIOCIRCOLATORIO

L'arresto cardiocircolatorio consiste nella cessazione dell'attività di pompa meccanica del cuore, con interruzione immediata del circolo e del flusso ematico, che conduce ad una rapida deplezione di ossigeno ed alla depressione delle funzioni cerebrali.¹

L'arresto cardiaco può essere accidentale e quindi manifestarsi improvvisamente sul territorio, oppure controllato, se indotto in sala operatoria con l'aiuto della cardioplegia e della circolazione extra corporea (CPB) per consentire l'esecuzione di un intervento cardiocirurgico.

Un arresto cardiaco accidentale può verificarsi in presenza di cardiopatie preesistenti, oppure in assenza di patologie cardiache sottostanti. Può originare da alterazioni di varia natura dell'impulso elettrico o da ostacoli di natura meccanica. Sia nel caso in cui la genesi sia primitivamente di un tipo o dell'altro si determina l'inefficacia di entrambe le componenti.

Il meccanismo elettrico più comune è rappresentato dalla comparsa di fibrillazione ventricolare (FV), seguita da asistolia, attività elettrica senza polso (PEA) o tachicardia ventricolare (TV) senza polso.

Le cause meccaniche includono la rottura del ventricolo, il tamponamento cardiaco, l'ostruzione meccanica acuta di una coronaria e la rottura acuta di un vaso di grosso calibro. La conseguenza immediata è l'assenza di perfusione sistemica.²

L'arresto cardiaco è una condizione di morte clinica reversibile che, se non adeguatamente trattata, è destinata ad evolvere in morte biologica irreversibile a causa della ipossia cerebrale. La probabilità che le manovre rianimatorie abbiano successo è condizionata dall'ambiente in cui si verifica l'arresto, dal meccanismo responsabile, dalle condizioni cliniche di base del paziente e dall'efficacia e prontezza del trattamento effettuato.

Le cause di arresto cardiaco³ possono essere schematicamente divise anche in:

- cardiache (tra le quali, la più frequente è la cardiopatia ischemica);
- non cardiache, meno frequenti, a loro volta suddivisibili in meccaniche (tamponamento cardiaco, embolia polmonare, pneumotorace iperteso, e altre) e anossiche (ad esempio ostruzione delle vie aeree ed eventi neurologici).

L'insorgenza dell'arresto cardiaco è spesso istantanea, senza segni clinici o sintomi premonitori. L'evoluzione dell'arresto cardiaco verso la morte biologica irreversibile dipende in maniera critica dal tempo che intercorre tra l'evento primario e la messa in atto delle manovre assistenziali.

Il cervello è molto sensibile all'anossia derivante dall'arresto di circolo: in pochi secondi si ha perdita di coscienza, mentre dopo circa 4 minuti si hanno danni irreversibili. Il cuore è meno sensibile, ma anche l'attività cardiaca va deteriorandosi nel giro di qualche minuto; la TV senza polso e la FV, che sono in genere i ritmi di esordio dell'arresto cardiaco da ischemia miocardica, decadono in qualche minuto a FV a basso voltaggio, e infine ad asistolia.

Ai giorni nostri, la malattia coronarica costituisce una delle principali cause di mortalità: risulta essere responsabile di 1/3 delle morti nella popolazione mondiale al di sopra dei 35 anni.²

In Europa, secondo le attuali linee guida ERC, soltanto la malattia cardiovascolare è responsabile di circa il 40% di tutte le morti nella fascia d'età inferiore ai 75 anni e in particolare l'arresto cardiaco improvviso da cardiopatia ischemica è responsabile di più del 60% dei decessi. Si stima che l'incidenza annuale di arresti cardiaci sia variabile tra 0,3 - 3/1.000 abitanti/anno per l'età compresa tra i 20 e i 75 anni con una percentuale di sopravvivenza alla dimissione ospedaliera che si attesta attorno al 10-20%. Di questi, il 30% sviluppa un'encefalopatia post-anossica.

Da tempo ormai si cerca quindi di identificare l'approccio più idoneo ed efficace nel trattamento e nella prevenzione di questo infausto evento e dei suoi esiti. Con questo obiettivo sono nati concetti quali la catena della sopravvivenza o la defibrillazione precoce, e per questo si cerca continuamente di sensibilizzare la popolazione sull'argomento e istruirla nell'esecuzione delle manovre di rianimazione cardiopolmonare e sull'utilizzo di semplici macchinari salvavita.

Un'altra ben distinta forma di arresto cardiaco è l'arresto cardiaco cardioplegico necessario per eseguire la maggior parte degli interventi cardiocirurgici. In ambito cardiocirurgico, complessivamente ogni anno vengono eseguiti oltre 800.000 interventi di bypass coronarici o interventi di chirurgia valvolare, con all'incirca 1000 interventi cardiocirurgici di questo tipo svolti ogni giorno solo negli Stati Uniti.⁴ Presso l'U.O. di Cardiocirurgia di Verona ogni anno vengono svolti circa 1000 interventi con ausilio di CPB e arresto cardiaco cardioplegico ottenuto con somministrazione di soluzione cardioplegica negli osti coronarici e nel seno coronarico venoso. La soluzione cardioplegica permette di fermare il cuore e proteggere in parte il cuore dal danno da ischemia e riperfusione. In questo caso tuttavia il danno da ischemia e riperfusione coinvolge solo il cuore che durante l'intervento deve essere mantenuto fermo ed esangue; tutti gli altri organi, compreso l'encefalo, sono invece perfusi grazie al CPB non creando quindi solitamente un danno cerebrale se non in caso di ateromasia carotidea, embolismi o eventuali complicanze.

Diverso è invece quello che succede durante l'arresto di circolo nella chirurgia dell'arco aortico. Durante la chirurgia dell'arco aortico è necessario un arresto di circolo, cioè l'interruzione del flusso di sangue che fino a quel momento dell'intervento viene supportato dal CPB, durante questo periodo di arresto di circolo il risultato è un diffuso danno ipossico ischemico per tutti gli organi. Tuttavia, la conseguenza più grave indotta dall'arresto di circolo di grande interesse clinico, per la funzione che questo organo possiede, è sicuramente il danno ischemico all'encefalo: per questo motivo le strategie di protezione dal danno ipossico-ischemico sono state principalmente volte alla protezione cerebrale. In particolare, negli ultimi decenni sono state sviluppate e si sono diffuse 3 principali strategie di protezione cerebrale per i pazienti sottoposti a intervento chirurgico sull'arco aortico: arresto di circolo in ipotermia profonda (DHCA), perfusione cerebrale retrograda (RCP), e perfusione cerebrale anterograda (ACP). Pertanto, l'eventuale superiorità di una di queste 3 tecniche è un tema costante di dibattito; inoltre la ricerca di nuove tecniche di perfusione e di una sempre migliore e più corretta gestione della temperatura corporea durante e dopo l'arresto di circolo è sempre in corso e in continuo aggiornamento. Infatti, l'uso recente della perfusione cerebrale ha portato all'utilizzo di temperature più alte durante l'arresto circolatorio presso molti centri che si occupano di chirurgia aortica, applicando quindi un'ipotermia moderata o addirittura lieve anziché profonda. Nonostante il ruolo protettivo esercitato dall'ipotermia sia ormai certo, e nonostante una sempre maggiore tendenza all'impiego dell'ipotermia ad esempio durante la ripresa post arresto cardiaco, essa porta con sé anche alcuni effetti avversi. Inoltre, durante chirurgia aortica, il raggiungimento di un'ipotermia profonda e successivamente il riscaldamento per il recupero della temperatura corporea normale prolunga i tempi dell'intervento e i tempi di assistenza con CPB, per questo risulta di grande interesse determinare quale sia la temperatura più adeguata a mantenere un effetto protettivo e allo stesso tempo a ridurre gli effetti avversi e i tempi operatori al minimo possibile.

POST RESUSCITATION DISEASE

All'inizio degli anni '70, il dott. Vladimir Negovsky denominò la condizione che si delinea a seguito di un arresto cardiaco come *post-resuscitation disease*, oggi denominata *post-cardiac arrest syndrome*, quindi sindrome post-arresto cardiaco. Egli cercò di riconoscerne l'eziologia e le fasi dei processi patologici che seguono l'arresto cardiaco.^{5,6}

La sindrome post-arresto cardiaco coinvolge molteplici organi, arrecandone un danno che si verifica sia durante che dopo la riperfusione.

I quattro componenti chiave della sindrome post-arresto cardiaco sono:

- danno cerebrale post-arresto,
- disfunzione miocardica post-arresto,
- danno sistemico da ischemia-riperfusione,
- patologie croniche sottostanti che si riacutizzano.

Sindrome	Fisiopatologia	Manifestazioni cliniche	Possibilità di trattamento
Danno cerebrale post-arresto	<ul style="list-style-type: none"> - compromissione dell'autoregolazione cerebro-vascolare - edema cerebrale - neurodegenerazione post-ischemica 	<ul style="list-style-type: none"> - coma - crisi e miocloni - disfunzioni cognitive - stroke corticale e spinale - morte cerebrale 	<ul style="list-style-type: none"> - ipotermia terapeutica - ottimizzazione emodinamica - controllo delle crisi - controllo saturazione (94-96%) - terapie di supporto
Disfunzione miocardica post-arresto	<ul style="list-style-type: none"> - ipocinesia globale (stunning miocardico) - riduzione dell'output cardiaco - sindrome coronarica acuta 	<ul style="list-style-type: none"> - infarto miocardico acuto - ipotensione, - shock cardiogeno - aritmie 	<ul style="list-style-type: none"> - ottimizzazione emodinamica - fluidi e.v. - inotropi - IABP - LVAD - ECMO
Danno da ischemia-riperfusione sistemico	<ul style="list-style-type: none"> - SIRS - compromissione della vasoregolazione - alterazioni della coagulazione - soppressione adrenergica - compromissione dell'oxigen delivery - compromissione resistenza infezioni 	<ul style="list-style-type: none"> - ipossia/ischemia tissutale - ipotensione - collasso cardiovascolare - febbre - iperglicemia - multi-organ failure (MOF) - infezioni 	<ul style="list-style-type: none"> - ottimizzazione emodinamica - fluidi e.v. - vasopressori - emofiltrazione ad alto volume - controllo della temperatura - controllo del glucosio - trattamento antibiotico su infezione
Riacutizzazioni di patologie croniche	<ul style="list-style-type: none"> - malattie cardiovascolari - BPCO, asma - malattia tromboembolica - tossicità trattamento farmacologico - infezioni (sepsi, polmoniti) - accidenti cerebrovascolari 	<ul style="list-style-type: none"> - specifiche in base all'eziologia, ma complicate dalla concomitante sindrome post-arresto 	<ul style="list-style-type: none"> - patologia-specifico, tenendo conto della sottostante sindrome post-arresto

Tabella I: Schematizzazione dei fattori che determinano la sindrome post-arresto e possibilità di trattamento.

La severità di queste problematiche dopo la ripresa della circolazione spontanea non è uniforme e può variare da paziente a paziente, sulla base della gravità dell'insulto ischemico, delle cause dell'arresto cardiaco e dello stato di salute pre-arresto. Se la ripresa della circolazione spontanea (ROSC) è precoce, la sindrome post-arresto potrebbe non verificarsi.

1.2 DANNO CEREBRALE

Il peso del cervello umano adulto è circa 4-5% del peso corporeo (circa 1400 g). La media del flusso sanguigno cerebrale è di circa 750 ml/min a 37° C, circa il 15% della gittata cardiaca, da cui deriva una perfusione di 55ml/min/100g di tessuto cerebrale.⁷ In normotermia, il consumo di ossigeno da parte del cervello è di 2,90 ml/g/min (20% del consumo totale di ossigeno del corpo). L'encefalo è un tessuto altamente aerobio, dove il fattore limitante è tendenzialmente rappresentato dall'ossigeno e non dai substrati metabolici. L'esito clinico di un'ischemia cerebrale globale varia con la gravità dell'insulto. Nei casi lievi si possono verificare solo stati confusionali transitori post-ischemici con recupero completo e nessun danno tissutale. D'altra parte, un danno irreversibile al tessuto cerebrale può verificarsi in alcuni pazienti che soffrano di insulti ischemici globali lievi o transitori. Esiste una gerarchia nel sistema nervoso centrale con cellule che mostrano una suscettibilità preferenziale. I neuroni sono le cellule più sensibili, inoltre vi è una grande variabilità di suscettibilità tra diverse popolazioni di neuroni nelle diverse regioni dell'encefalo, ciò dipende in parte dalle differenze nel flusso ematico cerebrale regionale e in parte dalle richieste metaboliche cellulari. Nell'ischemia globale grave si verifica una morte neuronale diffusa, indipendentemente dalla vulnerabilità regionale.

FISIOPATOLOGIA DEL DANNO ISCHEMICO

Durante l'arresto di circolo la perfusione d'organo è nulla, dal punto di vista molecolare questo sarà seguito da una cascata di eventi funzionali e biochimici che vanno a configurare il danno da ischemia. In assenza di perfusione il primo meccanismo a interrompersi è la respirazione aerobica. Il mitocondrio può venire danneggiato in vari modi dall'insulto ischemico (per aumento del Ca^{2+} citosolico, stress ossidativo, perossidazione lipidica) ma l'esito finale è la perdita del potenziale di membrana, d'importanza cruciale per la fosforilazione ossidativa e quindi la produzione di ATP. Nello stato ipossico quindi si deve ricorrere alla seconda via di produzione dell'ATP: la glicolisi anaerobia, sicuramente meno efficiente e con azione limitata nel breve termine soprattutto per tessuti con minori riserve di glucosio. La deplezione di ATP sotto livelli normali ha ampi effetti intracellulari quali la riduzione dell'attività di pompa di membrana del Na^+/K^+ ATP-dipendente che avrà come conseguenza diretta sia l'accumulo intracellulare di Na^+ , e quindi di H_2O causando rigonfiamento cellulare, sia l'aumentata fuoriuscita di K^+ e l'insufficienza della pompa del Ca^{2+} che determina un accumulo di Ca^{2+}

intracellulare. Inoltre, lo stato di glicolisi anaerobia va velocemente a consumare le riserve di glicogeno cellulare e provoca un abbassamento del pH con conseguente disfunzione di molti enzimi cellulari. L'aumento del Ca^{2+} intracellulare in particolare è a sua volta conseguenza di numerosi danni attivando un certo numero di enzimi con potenziali effetti deleteri. Gli enzimi che vengono attivati comprendono le ATPasi che accelerano il consumo di ATP, le fosfolipasi e le proteasi che promuovono il danno di membrana e le endonucleasi responsabili invece del danno al DNA e della cromatina nucleare. Inoltre, l'eccesso di Ca^{2+} intracellulare può, assieme al danno mitocondriale, indurre e innescare la morte cellulare per via apoptotica. Un altro evento cruciale per la sopravvivenza della cellula è la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), prodotti anche fisiologicamente durante i normali processi metabolici. Essi sono coinvolti in numerosi processi biologici: la perossidazione lipidica delle membrane, le alterazioni ossidative delle proteine, che ne incrementano la degradazione, e il danno al DNA. Il danno di membrana che coinvolge i lisosomi determina la fuoriuscita di enzimi citolitici che porteranno a fenomeni di necrosi cellulare.

Riassumendo possiamo distinguere una serie di eventi precoci e potenzialmente reversibili, se la disponibilità di ossigeno viene ripristinata, e una serie di eventi invece irreversibili che conducono inevitabilmente la cellula alla morte.

Danni potenzialmente reversibili sono le disfunzioni di pompa, la glicolisi e la ridotta sintesi proteica che comportano a livello ultrastrutturale il rigonfiamento della cellula e del reticolo endoplasmatico, la perdita dei microvilli e la dispersione del citoscheletro con la formazione di “blebs”. Nel momento in cui però queste alterazioni si trasformano in un grave rigonfiamento mitocondriale, un esteso danno della membrana plasmatica, con perdita di fosfolipidi, alterazioni del citoscheletro, produzione di ROS, e in un'attivazione degli enzimi lisosomiali il danno diventa irreversibile. La morte cellulare avviene principalmente per necrosi anche se l'apoptosi può svolgere un ruolo significativo.

In alcune situazioni però il danno cellulare si alimenta e si protrae anche al cessare dell'insulto ischemico, ovvero dopo la riperfusione. Questo fenomeno prende il nome di danno da ischemia-riperfusione, e risulta rilevante anche dal punto di vista clinico. È probabilmente da imputare alla messa in moto di nuovi processi di danno di cui sono stati proposti molti meccanismi tra cui l'aumentata produzione di ROS da parte delle cellule endoteliali e dai leucociti dell'infiltrato infiammatorio, l'ulteriore danno mitocondriale da questi stessi prodotto, il danno da flogosi e l'attivazione della via del complemento.⁸

Si è visto poi come questi effetti post ischemici siano esacerbati quando la temperatura del paziente aumenta di $0,5^{\circ}\text{C}$ o più oltre i 37°C . L'ipertermia, infatti, attiva i recettori delle N-

metil-D-aspartato che contribuiscono all'elevazione dei livelli di calcio intracellulare nonché all'aumentata generazione di ossido nitrico. L'ipertermia quindi potenzia gli effetti dannosi dei radicali liberi generati dal rilascio di acido arachidonico.⁹

ISTOPATOLOGIA

Esistono diverse forme ben caratterizzate di reazione patologica dei neuroni, fra cui le principali consistono nella degenerazione neuronale e nella morte cellulare e le reazioni associate ai meccanismi riparativi dopo il danno.

Il danno neuronale acuto (neurone rosso) si riferisce a una serie di cambiamenti correlati all'ipossia/ischemia acuta del sistema nervoso centrale. I neuroni rossi si osservano all'ematossilina eosina dopo circa 12-24 ore dall'insulto, si assiste ad una contrazione del corpo cellulare, picnosi del nucleo, scomparsa del nucleolo e perdita della sostanza di Nissl, con eosinofilia intensa del citoplasma. Ancora prima di questi fenomeni già dopo 4-8 ore dall'evento ischemico è possibile osservare piccoli vacuoli nel corpo cellulare. La gliosi è l'indicatore istopatologico più importante di danno di diversa origine; gli astrociti diventano ipertrofici e crescono in numero. Il nucleo si ingrandisce e diventa vescicolare ed il nucleolo è prominente. Il citoplasma si espande e da questo emergono numerosi processi larghi e ramificati. Nel danno di lunga durata i nuclei diventano invece piccoli e scuri. Il rigonfiamento cellulare si verifica regolarmente in caso di insulti acuti, quando c'è un'insufficienza dei sistemi delle pompe cellulari.

Nel quadro dell'ischemia globale, l'encefalo è rigonfio, le circonvoluzioni sono allargate e i solchi ristretti. C'è una scarsa demarcazione tra sostanza bianca e grigia.

Cambiamenti precoci: si manifestano nelle 12-24 ore successive all'insulto e comprendono cambiamenti acuti a carico dei neuroni caratterizzati inizialmente da micro-vacuolizzazione, quindi da eosinofilia del citoplasma e in seguito da picnosi e carioressi nucleare. Cambiamenti simili si verificano leggermente più tardi anche negli astrociti e nell'oligodendrogliia. Le cellule piramidali CA1 dell'ippocampo, le cellule cerebellari di Purkinje e i neuroni piramidali della neocortex sono quelli più suscettibili a un'ischemia globale di breve durata. Dopo il danno acuto la reazione al danno tissutale continua con un'infiltrazione di neutrofili.

Cambiamenti subacuti: si verificano da 24 ore a 2 settimane e comprendono la necrosi del tessuto, la comparsa di macrofagi, la proliferazione vascolare e la gliosi reattiva. Macroscopicamente il tessuto diventa pallido, molle, tumefatto e la giunzione

corticomidollare si fa indistinta. Successivamente il parenchima diventa gelatinoso e friabile e il confine si fa ancora più indistinto.

Riparazione: avviene dopo 2 settimane è caratterizzata da rimozione di tutto il tessuto necrotico, dalla perdita della normale organizzazione strutturale e da gliosi. Macroscopicamente il tessuto va incontro a liquefazione, lasciando una cavità di contenuto liquido rivestita da un tessuto scuro grigiastro. Dopo parecchi mesi, lo spiccato ingrossamento del nucleo e del citoplasma degli astrociti regredisce, e questi vanno a formare un denso agglomerato di fibre gliali frammiste a capillari neoformati e a scarse fibre perivascolari di tessuto connettivo.

1.3 NEUROPROTEZIONE

A causa della elevata suscettibilità dell'encefalo a periodi di ischemia e rappresentando il danno neurologico una delle maggiori complicanze che rientrano nella cosiddetta sindrome post- arresto, sono numerose le strategie adottate per cercare di ridurre il danno neurologico e per avere un'efficace neuroprotezione anche durante interventi che prevedano un arresto di circolo.

Tra i metodi più conosciuti per ridurre il metabolismo e lo sviluppo del danno neurologico l'ipotermia è sicuramente la più utilizzata e conosciuta, tuttavia altri metodi e farmaci con effetto neuro protettivo sono stati impiegati in diversi studi sperimentali ed alcuni di questi sono stati utilizzati nel corso dei nostri esperimenti presso il Laboratorio di ricerca Cardiovascolare: DADLE, WIN 55.212-2, ALM ed Ossido Nitrico.

1.3.1 IPOTERMIA

IPOTERMIA TERAPEUTICA: CENNI STORICI

L'ipotermia come pratica medica ha origini antiche, anche se con scopi e potenzialità diverse da quelli attuali. Esempi illustri, ci giungono già dall'antica Grecia: Ippocrate consigliava di bendare gli arti dei soldati feriti con ghiaccio e neve a scopo analgesico ed emostatico. Analogamente agli inizi del XIX secolo il chirurgo di Napoleone, il Barone Larrey, descrisse come i soldati che venivano riscaldati vicino al fuoco dopo essere stati operati avessero una sopravvivenza inferiore rispetto a coloro che venivano mantenuti in un ambiente freddo. In realtà anche il concetto di "ipotermia terapeutica total body" ha origini antiche: dallo studio e dalla semplice osservazione del fenomeno dell'ibernazione animale, gli antichi egizi usavano la pratica della mummificazione in camere fredde nella speranza un giorno di ridare la vita ai propri defunti¹⁰.

I primi tentativi moderni di sfruttare le proprietà benefiche dell'ipotermia risalgono ai primi decenni del '900. Risale al 1938 il tentativo da parte di Lawrence Smith e Temple Fay di arrestare la crescita del tumore prostatico e della cervice uterina, anche con un'applicazione locale ipotermica, che ebbe effettivamente un iniziale successo ma che non durava nel tempo.¹¹ Altro tentativo fallimentare fu quello di Talbott nel 1941 che utilizzò l'ipotermia total body come shock terapia nei pazienti psicotici.¹²

I decenni successivi videro un aumento d'interesse notevole sull'argomento che portarono via via ad acquisire sempre maggiori conoscenze riguardo ai meccanismi protettivi, e non, dell'ipotermia soprattutto in termini di neuroprotezione e che posero le basi per le attuali applicazioni cliniche. Già negli anni '50 furono sperimentati gli effetti neuroprotettivi dell'ipotermia in pazienti con trauma cranico, e buoni risultati ottenne, ad esempio, Botterell nel trattamento di aneurismi cerebrali preservando il tessuto cerebrale dall'anossia indotta dall'intervento chirurgico e dal vasospasmo.¹³ Numerosi furono poi, negli stessi anni, gli esperimenti di Rosomoff sul cane che, andando a studiare gli effetti dell'ipotermia, diedero quindi delle evidenze scientifiche sempre più solide del beneficio dell'ipotermia dopo eventi ischemici cerebrali e danno traumatico cerebrale.¹⁴ Per non parlare delle evidenze laboratoristiche di Bigelow che permisero di introdurre l'arresto cardiocircolatorio temporaneo e reversibile prima nel cane e poi nella pratica cardiocirurgica consentendo interventi con campo operatorio esangue.¹⁵

Sempre a questi anni si rifanno inoltre i primi studi sull'ipotermia terapeutica dopo arresto cardiaco. Benson et al.¹⁶ in uno studio del 1959 descrivono l'outcome di una dozzina di pazienti vittime di arresto cardiaco trattate con ipotermia terapeutica con una sopravvivenza del gruppo trattato del 50% contro il solo 14% dei non trattati, mentre un risultato ancora più clamoroso lo ottenne uno studio di Williams¹⁷ che riportò un tasso di sopravvivenza del 83% dei trattati a fronte del 25% dei non trattati.

Tuttavia, assieme alle evidenze cliniche positive iniziarono ad emergere anche gli importanti effetti collaterali, associati soprattutto all'utilizzo dell'ipotermia profonda (20-30°C), che rendeva questo trattamento impraticabile in molte situazioni. Gli ulteriori studi sperimentali su cavie animali però, intensificatesi dagli anni '80, portarono alla luce gli effettivi benefici anche a temperature più moderate di ipotermia (32-35°C), con effetti collaterali minori e una gestione clinica sicuramente facilitata.^{18,19}

Questi studi permisero quindi di acquisire conoscenze sulla sicurezza e fattibilità del trattamento ipotermico tali da poter realizzare studi clinici sempre di più ampio respiro. Emblematici furono poi due grandi trial clinici controllati e randomizzati pubblicati dal New England Journal nel Febbraio del 2002 che posero le basi delle conoscenze dell'ipotermia terapeutica come mezzo per migliorare significativamente l'outcome di pazienti sopravvissuti ad arresto cardiaco.

Il primo studio condotto dall'Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group²⁰ includeva 274 pazienti colpiti da arresto cardiaco da fibrillazione ventricolare. Questi pazienti vennero randomizzati in due gruppi: 137 nel gruppo trattato con ipotermia e 138 nel gruppo trattato

con normotermia. Dopo un raffreddamento rapido ottenuto con presidi esterni e impacchi di ghiaccio e un mantenimento della temperatura compresa tra 32° e 34°C per 24 ore, seguito da un riscaldamento di 8 ore, i pazienti trattati con ipotermia mostrarono un miglior outcome neurologico rispetto al gruppo trattato in modo standard normotermico. Nello specifico si dimostrò un buon esito neurologico a sei mesi nel 55% dei pazienti ipotermici rispetto al 39% di quelli normotermici, e anche la mortalità a sei mesi risultò ridotta nel gruppo ipotermico (35%) rispetto al gruppo normotermico (55%).

Il secondo studio invece fu condotto da Bernard et al.²¹ che aveva avuto già buoni risultati con studi precedenti.²² In quello del 2002 arruolò 77 pazienti dei quali 43 vennero trattati con ipotermia e 34 con normotermia. Per evitare il brivido, i pazienti venivano preventivamente sedati e curarizzati e lo stato ipotermico veniva indotto a partire da 2 ore dalla ripresa di circolo con l'utilizzo di impacchi di ghiaccio alla testa, collo, torso e arti fino al raggiungimento dei 33°C previsti dal protocollo, temperatura che veniva mantenuta per 12 ore. Il successivo riscaldamento invece avveniva con aria calda e coperte nell'arco di 6 ore. Il risultato dello studio vide come il 49% dei pazienti trattati con ipotermia avessero un buon outcome neurologico, valutato come dimissione a casa o in struttura di riabilitazione, contro il 26% dei pazienti trattati con normotermia. La differenza di mortalità tra i due gruppi invece non si dimostrò statisticamente significativa. Lo studio inoltre si pose anche l'obiettivo di valutare gli effetti ematologici, biochimici ed emodinamici. Gli autori non documentarono effetti avversi clinicamente significativi in termini di aritmie, estensione del danno miocardico (i livelli di CK-MB erano simili in entrambi i gruppi), alterazioni dell'assetto emocoagulativo o aumentata incidenza di infezioni.

Questi due studi hanno quindi rappresentato due pietre miliari per la pratica clinica dell'ipotermia terapeutica e l'attenzione e l'interesse sul tema sono enormemente cresciute tanto che nel 2003 proprio sulla base dei due studi clinici sopramenzionati l'Advanced Life Support Task Force dell' International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) pubblicò un Advisory Statement²³ ponendo come indicazione terapeutica l'ipotermia per pazienti incoscienti con ritorno di circolo dopo arresto cardiaco (Figura 1): in particolare si raccomanda “il mantenimento di una temperatura tra 32° e 34°C per un tempo compreso tra le 12 e 24 ore”. L'indicazione però è stata posta come di Livello di Evidenza 1 solo per pazienti con ritmo iniziale di Fibrillazione Ventricolare o Tachicardia Ventricolare, mentre di Livello 4 per pazienti con altri tipi di ritmo.

Queste stesse indicazioni sono poi state inserite anche nelle linee guida rianimatorie dell'ERC nel 2005²⁴, per poi venire modificate, soprattutto per quando riguarda l'indicazione di utilizzo,

nelle linee guida del 2010²⁵ dove ne è stato ampliato l'utilizzo anche in pazienti passati da un ritmo non defibrillabile a uno defibrillabile, anche se ne è tuttora riconosciuto il minor livello di evidenza, in quanto, nonostante si siano avuti effettivamente dei riscontri positivi, mancano ancora degli studi prospettici su larga scala.²⁶ Inoltre nelle stesse linee guida è stato riconosciuto che molti dei predittori accettati di esito sfavorevole nei sopravvissuti in stato comatoso di arresto cardiaco non sono attendibili, soprattutto se il paziente è stato trattato con ipotermia terapeutica.

Negli ultimi anni tuttavia l'utilizzo dell'ipotermia dopo arresto cardiaco è andato diminuendo, soprattutto dopo la pubblicazione nel 2013 del Targeted Temperature Management trial in cui si evidenziava come sia più importante evitare innalzamento della temperatura piuttosto che abbassarla, mantenendo quindi la normotermia o un'ipotermia minima (35-36°C). Dopo aver preso gli ultimi studi in considerazione ILCOR ha quindi ridotto le raccomandazioni a favore dell'ipotermia lasciando ai medici l'opzione di scegliere se mantenere per almeno 24 ore una temperatura target tra i 32 e i 36°C, senza iniziare il raffreddamento attivo prima dell'arrivo in ospedale. Nel frattempo, le evidenze scientifiche correnti suggeriscono più l'importanza dell'evitare innalzamento della temperatura sopra i 36°C piuttosto che nell'indurre attivamente ipotermia.



Figura 1: *Ipotetica visione della Catena della Sopravvivenza.*

EFFETTI DELL'IPOTERMIA

Nel contesto specifico dell'ipotermia, l'intero organismo reagisce con vari meccanismi riflessi al fine di generare calore: il brivido, l'inibizione della sudorazione, una forte risposta simpatica ed altri meccanismi per l'aumento della produzione di calore. Il brivido viene innescato dal centro motorio primario del brivido situato nell'ipotalamo posteriore che viene attivato da segnali del freddo provenienti dalla cute o dal midollo spinale quando si raggiunge un livello critico. Il brivido di massima intensità può comportare un aumento del consumo di ossigeno dal 40% fino ad un 100% rispetto al basale e ciò è significativo dell'importante ruolo nella produzione di calore che può così aumentare anche di 4-5 volte rispetto al basale. La risposta simpatica, poi, innesca numerosi fenomeni come, prima di tutto, una potente vasocostrizione periferica, in particolare del distretto cutaneo fino a 2-3 cm di profondità. L'attivazione delle fibre simpatiche insieme al rilascio di ormoni come adrenalina, noradrenalina e nel lungo periodo anche di ormoni tiroidei vanno a costituire l'effetto definito "termogenesi chimica". La termogenesi chimica è però direttamente proporzionale alla quantità di grasso bruno presente, particolarmente ricco di mitocondri. Sfortunatamente l'uomo adulto ha solo una piccolissima quantità di grasso bruno, ma ben più rilevante risulta essere nel neonato, dove riveste effettivamente un importante ruolo termogenico. Da tutti questi meccanismi a livello sistemico ne deriveranno una serie di variazioni fisiologiche come l'aumento del consumo di ossigeno, l'aumento della frequenza respiratoria, l'aumento della frequenza cardiaca, del volume di eiezione e della portata cardiaca, e un aumento della pressione arteriosa.

Il sistema regolatorio ipotalamico però presenta un valore soglia limite. A temperature corporee inferiori ai 29°C l'ipotalamo perde completamente ogni capacità regolatoria che già ai 34°C è gravemente compromessa. I fattori che spiegano ciò sono la ridotta produzione di calore per progressivi abbassamenti di temperatura, la sonnolenza e il coma che deprimono l'attività del SNC impedendo la comparsa del brivido. L'ultimo tentativo di difesa dell'organismo a queste situazioni è infine la paralisi della muscolatura liscia delle pareti vasali che comporta una brusca vasodilatazione che si manifesta con un arrossamento della cute.²⁷ (Figura 2) La fisiologica risposta del nostro organismo ad un eventuale ipotermia terapeutica risulta controproducente rispetto all'obiettivo terapeutico. Per questo motivo risulta fondamentale un'adeguata somministrazione di sedativi, anestetici, oppiacei e/o miorilassanti. Le maggiori evidenze del danno da ischemia, e quindi dei meccanismi protettivi dell'ipotermia, derivano da studi nel campo della neuroprotezione.

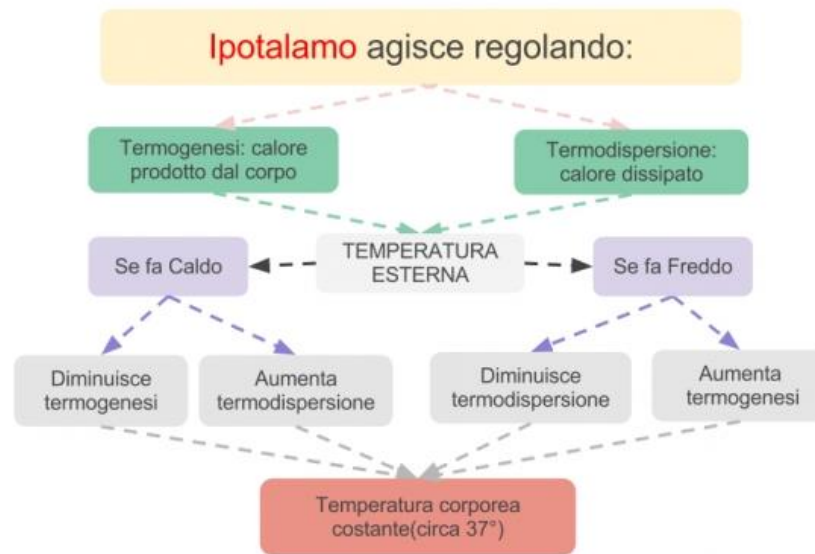


Figura 2: Rappresentazione schematica della termoregolazione ipotalamica.

Diminuzione del metabolismo cerebrale.

L'ipotermia è un modificatore significativo del flusso e del metabolismo cerebrale.²⁸ Gli studi hanno confermato che vi è un 6% - 7% di calo del metabolismo per ogni 1° C sotto i 37° C; a 36°C il consumo di ossigeno è 2,9 ml/g/min, a 25°C il consumo di ossigeno è ridotto a 0,90 ml/g/min ed a 20 ° C si è ridotto ad un quinto dei valori normotermici, con scarso effetto al di sotto di questa temperatura.²⁹

Apoptosi, Caspasi e proteolisi mitocondriale.

L'apoptosi vede coinvolti diversi processi cellulari come la disfunzione mitocondriale e il rilascio di particolari proteine enzimatiche chiamate Caspasi.³⁰ Numerosi studi hanno dimostrato come l'ipotermia interrompa la via apoptotica e i danni associati soprattutto nelle fasi iniziali del processo³¹ inibendo in particolare l'attivazione delle caspasi. Gli effetti dell'ipotermia includono anche la prevenzione della disfunzione mitocondriale, la riduzione del sovraccarico di neurotrasmettitori eccitatori, e la modifica delle concentrazioni intracellulari di ioni.³²

Pompe ioniche e neuroeccitazione.

Un grande numero di evidenze suggerisce che l'ipotermia inibisce i processi nocivi neuroeccitatori che si verificano nelle cellule cerebrali durante l'ischemia-riperfusion, processi caratterizzati da un calo drastico di metaboliti come ATP e fosfocreatina. Inoltre

promuove sia l'attivazione genica sia la depolarizzazione delle membrane neuronali con rilascio di grande quantità di glutammato. Questo porta ad una prolungata ed eccessiva attivazione dei recettori di membrana del glutammato, che stimola l'ulteriore afflusso di Ca^{2+} attraverso l'attivazione dei canali del Ca^{2+} provocando un circolo vizioso, la cosiddetta “cascata eccitotossica”.³³

Risposta immunitaria ed infiammazione.

Nella maggior parte dei tipi di lesioni cerebrali, già dopo un'ora inizia una ingente risposta infiammatoria. Citochine pro-infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale (TNF) e l'interleuchina-1 (IL-1), vengono rilasciati in grandi quantità da astrociti, cellule microgliali e cellule endoteliali; questo aumento inizia circa 1 ora dopo la lesione e resta elevato fino a 5 giorni dopo.³⁴ A questi si aggiungeranno tutti gli altri eventi fisiopatologici che vanno a caratterizzare una risposta infiammatoria quali la chemiotassi dei leucociti attivati, l'espressione di molecole di adesione endoteliale, l'attivazione del sistema del complemento, e migrazione di neutrofili e macrofagi. Questi ultimi in particolare con la loro azione fagocitica sono responsabili dell'ulteriore danno cerebrale. Durante la fase di riperfusione si aggiungerà poi anche il danno da radicali liberi.

Numerosi esperimenti su animali e alcuni studi clinici hanno dimostrato che l'ipotermia sopprime le reazioni infiammatorie e il rilascio di citochine pro-infiammatorie a seguito dell'ischemia.^{35,36} L'ipotermia impedisce o riduce anche il danno al DNA mediato dalla riperfusione, la perossidazione lipidica, e la produzione di leucotrieni. Diminuisce poi la produzione di ossido nitrico da parte dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), che è un agente chiave nello sviluppo del danno cerebrale post-ischemico.

Produzione di radicali liberi.

I radicali liberi dell'ossigeno tra cui l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e i radicali idrossilici (OH^-), hanno un ruolo importante nel danno e nella morte cellulare potendo danneggiarne e ossidarne numerosi componenti. Le cellule del cervello hanno normalmente diversi meccanismi antiossidanti, enzimatici e non, che impediscono questo tipo di lesioni, ma la produzione di ROS dopo l'ischemia e la riperfusione è così grande da non poter essere neutralizzata.

L'ipotermia riduce significativamente la produzione di radicali liberi e permette quindi ai sistemi antiossidanti endogeni di prevenire o per lo meno attenuare il danno ossidativo e consente inoltre alla cellula di riparare eventuali danni.^{37,38}

Permeabilità vascolare, barriera emato-encefalica, e formazione di edema.

Il danno da ischemia-riperfusion e da trauma può portare a notevoli disfunzioni della barriera emato-encefalica, e al successivo sviluppo di edema cerebrale. Il danno da ischemia-riperfusion va a compromettere l'integrità delle membrane cellulari causando una maggiore permeabilità vascolare delle cellule endoteliali nel cervello, mediata dal fattore di crescita VEGF tramite il rilascio di ossido nitrico.³⁹ L'ipotermia moderata riduce in modo significativo le interruzioni della barriera emato-encefalica, e diminuisce anche la permeabilità vascolare conseguente all'ischemia-riperfusion.^{40,41} Questi processi di disintegrazione di membrana indotto dall'ipossia possono essere attenuati o eliminati dall'ipotermia che risulta quindi essere uno stabilizzatore di membrana.⁴²

Temperatura e Thermopooling cerebrale.

Il fenomeno del Thermopooling cerebrale implica l'aumento significativo della temperatura di alcune aree cerebrali rispetto alle altre. Anche in individui in buona salute, la temperatura del cervello è leggermente superiore alla temperatura del core. Questa differenza può aumentare in modo significativo nei pazienti vittime di lesioni neurologiche, con gradienti che vanno da 0,1°C a più di 2°C, con le aree lese ipertermiche rispetto alle sane differenza che può aumentare ancora di più quando un paziente sviluppa febbre, un fenomeno molto frequente in pazienti con lesioni neurologiche.^{43,44} La ragione di questo è che alcuni dei meccanismi distruttivi sopra discussi (l'eccitotossicità, la risposta infiammatoria, i ROS ed il thermopooling stesso) possono portare alla generazione eccessiva di calore. Questo comporta la difficoltà nel ridurre il calore in eccesso generato nelle aree danneggiate del cervello a causa dello sviluppo di edema cerebrale locale, che lo intrappola nelle aree lese. Numerosi studi clinici hanno confermato che la febbre è davvero un predittore di outcome sfavorevole a seguito di ictus, trauma cranico, e anossia da arresto cardiaco. L'ipotermia può quindi essere utilizzata per prevenire o mitigare il fenomeno del thermopooling.⁴⁵

Attivazione della Coagulazione e Formazione di microtrombi

In caso di arresto cardiaco vi è una marcata attivazione della coagulazione, che può portare a formazione di microtrombi con blocco della microcircolazione nel cervello e nel cuore.⁴⁶ La somministrazione di anticoagulanti come eparina e ricombinante tissutale del plasminogeno migliora la riperfusion e la sopravvivenza in esperimenti su animali.⁴⁷

L'ipotermia d'altra parte ha alcuni effetti anticoagulanti come una lieve disfunzione piastrinica a temperature inferiori a 35°C, e un'inibizione della cascata della coagulazione a temperature inferiori a 33°C.⁴⁸

Mediatori vasoattivi

Diversi studi hanno dimostrato che l'ipotermia influenza la secrezione locale di sostanze vasoattive quali l'endotelina, trombossano A2, e prostaglandina I2 nel cervello e in altri siti. Questi svolgono un ruolo importante nella regolazione locale del flusso cerebrale di sangue, e un equilibrio tra i due è necessario per mantenere l'omeostasi. Questa omeostasi locale può essere interrotta dopo un evento ischemico o traumatico, con un relativo aumento della produzione di trombossano A2 portando a vasocostrizione, ipoperfusione e trombogenesi in aree lese del cervello.

Soppressione dell'attività epilettica

Lo stato epilettico non convulsivo si verifica frequentemente in pazienti con encefalopatia postischemica, ictus, trauma cranico ed emorragia sub aracnoidea.⁴⁹ Rimane incerto se lo stato non convulsivo sia una causa diretta del danno ischemico, ma ci sono crescenti evidenze che suggeriscono che la lesione cerebrale possa essere significativamente aumentata quando questo stato si verifica nella fase acuta della lesione cerebrale.⁵⁰ Studi su animali, piccoli studi e case report hanno fatto uso del raffreddamento per il trattamento dello stato epilettico.⁵¹

EVENTO DANNOSO	MECCANISMO DI PROTEZIONE
Consumo energetico	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione metabolismo cerebrale - Abbassamento livelli di lattato derivati dal metabolismo anaerobico - Miglioramento del metabolismo del glucosio cerebrale e conservazione delle riserve di glucosio nel cervello
Apoptosi	<ul style="list-style-type: none"> - Inibizione proliferazione, migrazione, trasformazione e attivazione delle cellule astrogliali - Riduzione di p53 nel cervello e morte neuronale apoptotica - Aumento livelli di proteine Bcl-2 e citocromo C - Blocco via TNF mediata dell'apoptosi - Prevenzione apoptosi inibendo via caspasi-mediata e aumentando Akt - Blocco delle proteine responsabili di mediare l'apoptosi caspasi-indipendente attraverso la formazione di HSP
Cascata eccitotossica	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione dei livelli extracellulari di neurotrasmettitori eccitatori
Infiammazione	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuzione produzione di citochine infiammatorie (IL1 e TNF) - Riduzione della perossidazione lipidica - Riduzione della risposta di cellule infiammatorie come macrofagi
Danno ossidativo	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione radicali liberi
Disfunzione BEE e edema cerebrale	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione rottura della BEE e dell'aumentata permeabilità di membrana - Riduzione edema cerebrale
Thermopooling	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione thermopooling cerebrale e della febbre che ne consegue
Vasocostrizione e trombogenesi	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione danni endoteliali - Azione anticoagulante - Riduzione concentrazioni di TXA2 ed endotelina - Aumento concentrazioni di prostaglandine I2

Tabella II: *Meccanismi neuroprotettivi dell'ipotermia.*

COMPLICANZE DELL'IPOTERMIA

Nel trattare di effetti collaterali ipotermia-indotti, occorre precisare come la distinzione tra effetti collaterali veri e propri e conseguenze “fisiologiche” dell'ipotermia è puramente artificiale e spesso mal delimitabile con certezza. Capita, infatti, che in alcuni pazienti particolarmente critici i cosiddetti cambiamenti fisiologici necessitino di un'adeguata prevenzione e trattamento attivo, mentre, al contrario, in altri pazienti possono verificarsi

anche chiari effetti avversi che però non richiedono alcun trattamento non comportando un rischio effettivo per il paziente.

Clearance dei farmaci

Sapendo che l'ipotermia deprime la funzione degli organi, capiamo come questa proprietà che viene sfruttata terapeuticamente risulta essere allo stesso tempo uno svantaggio dal punto di vista farmacologico. In stato di ipotermia, infatti, non solo i livelli sierici e la clearance, ma anche gli effetti dei vari farmaci possono cambiare. Recentemente Tortorici et al.⁵² in un lavoro pubblicato su *Critical Care Medicine* hanno documentato una riduzione importante dell'attività dei sistemi enzimatici basati sul citocromo P450 ed hanno analizzato gli effetti su vari farmaci estesamente utilizzati in Terapia Intensiva. L'ipotermia terapeutica lieve-moderata diminuisce del 7-22% la clearance sistemica dei farmaci metabolizzati dal citocromo P450 per ogni grado Celsius al di sotto dei 37°C. La potenza e l'efficacia di alcuni farmaci risulta inoltre diminuita. Nella maggior parte dei casi l'effetto dell'ipotermia è quello di aumentare i livelli di farmaco o di enfatizzarne l'effetto. Il meccanismo che sottende a questo è una riduzione dell'attività di molti enzimi epatici combinata però anche a una ridotta perfusione del fegato e una ridotta produzione di bile che porterà ad una diminuzione dell'escrezione di alcuni farmaci.

Disturbi elettrolitici

Disordini elettrolitici si possono sviluppare soprattutto durante la fase di induzione dell'ipotermia. La ragione di ciò è una combinazione tra l'aumento dell'escrezione renale di elettroliti e shift intracellulare. Tali disturbi elettrolitici possono aumentare il rischio di aritmie e di altri effetti negativi. Il Magnesio (Mg) può svolgere un ruolo importante nel ridurre lesioni cerebrali, danno miocardico ed aritmie. In vari modelli animali, infatti, si è visto come una deplezione significativa di Mg aumenta il danno cerebrale in modelli di trauma cranico e ictus, e studi clinici hanno analogamente dimostrato un miglior esito neurologico con l'integrazione di Mg in caso di emorragia sub aracnoidea.^{53,54} Queste variazioni in perdita valgono anche per altri elettroliti quali potassio e fosfato. Attenzione però si deve dare anche alla fase del riscaldamento quando al contrario i livelli di potassio possono aumentare per rilascio da parte delle cellule dello ione accumulato durante la fase di induzione. Questo è uno dei motivi per cui il riscaldamento dovrebbe essere fatto molto lentamente, dando ai reni il tempo di espellere l'eccesso di ione.

Iperglicemia

L'insorgenza di iperglicemia in corso di ipotermia è un evento abbastanza frequente legato alla contemporanea insorgenza di insulino-resistenza e riduzione di secrezione di insulina da parte delle cellule delle isole pancreatiche. Ciò richiede una gestione attiva in quanto l'iperglicemia può influenzare negativamente l'outcome nei pazienti critici aumentando anche la lesione cerebrale durante episodi di ischemia.⁵⁵

Effetti metabolici e gas del sangue

L'ipotermia porta ad un aumento della sintesi di glicerolo, acidi grassi liberi, acidi chetonici, e lattato, provocando una lieve acidosi metabolica. In contrasto con i livelli di pH misurati a livello extracellulare, il valore di pH intracellulare aumenta leggermente durante il raffreddamento. Poiché l'ipotermia indotta riduce il metabolismo, si ridurrà anche il consumo di ossigeno e la produzione di CO₂. Infatti, in campioni di sangue di pazienti in ipotermia pO₂ e pCO₂ saranno sovrastimati, mentre il pH sottostimato.

Parametri di coagulazione

L'ipotermia induce una lieve diatesi emorragica, con il tempo di sanguinamento aumentato a causa di effetti sulla conta delle piastrine, la funzione piastrinica, la cinetica di enzimi della coagulazione e inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno, e altri enzimi nella cascata della coagulazione.^{56,57} L'ipotermia non inizia ad influire sulla funzione piastrinica finché la temperatura non scende sotto i 35°C, e i fattori di coagulazione sono interessati solo quando la temperatura scende al di sotto di 33°C.

Infezioni

È noto che l'ipotermia compromette le funzioni immunitarie e inibisce diverse risposte infiammatorie. In effetti, questo effetto collaterale è sfruttato come vantaggio terapeutico in quanto lo spegnimento delle reazioni infiammatorie nel cervello potrebbe essere uno dei meccanismi attraverso i quali l'ipotermia potrebbe esercitare i propri effetti protettivi.⁵⁸ Questa immunosoppressione è dovuta all'inibizione della secrezione di citochine proinfiammatorie, della migrazione chemiotattica dei leucociti e della fagocitosi.³⁵ In realtà l'incidenza riportata di casi infettivi in ipotermia da qualsiasi causa è modesta, tranne il rischio fortemente aumentato di polmonite quando l'ipotermia è utilizzata per più di 24 ore. È stato riportato inoltre come l'ipotermia aumenti anche il rischio di infezioni della ferita.⁵⁹

Brividi

Causano aumento del consumo di ossigeno ed è quindi necessario sopprimere il brivido ai fini terapeutici e questo è reso possibile grazie all'impiego di numerosi farmaci tra sedativi, analgesici e miorilassanti oppure in alternativa sono stati introdotti clonidina e neostigmina.

Altri effetti collaterali.

L'ipotermia è associata anche ad alterata funzione intestinale e può aggravare i problemi di svuotamento gastrico. Inoltre, possono verificarsi alterazioni dei valori di laboratorio: oltre all'iperglicemia e agli squilibri elettrolitici, i cambiamenti più frequenti sono un aumento di amilasi ed transaminasi, lieve aumento dei livelli sierici di lattato (in media 2,5-5 mmol/L) e corpi chetonici e glicerolo (portando ad una lieve acidosi metabolica), e una diminuzione della conta piastrinica e talvolta anche dei globuli bianchi.⁶⁰

TECNICHE E TEMPISTICHE DI INDUZIONE DELL'IPOTERMIA

Sono stati testati numerosi metodi per ridurre sia la temperatura corporea in toto, sia localmente la temperatura del cuore o del cervello. La tecnica più semplice e meno invasiva è sicuramente il raffreddamento esterno attraverso impacchi di ghiaccio, piastre di metallo o circuiti di raffreddamento. Tuttavia, queste tecniche hanno lo svantaggio di abbassare lentamente la temperatura e di essere difficilmente controllabili portando anche inavvertitamente ad un eccessivo raffreddamento.

I metodi usati nella pratica clinica si distinguono in due grandi gruppi: le tecniche *invasive* e le tecniche *non invasive*.⁶¹

Tra le tecniche *non invasive* troviamo termocoperte e caschi "raffreddanti" attraverso aria o circuiti di acqua, impacco di ghiaccio applicato al capo, collo, tronco e radici degli arti, immersioni in acqua fredda e piastre di raffreddamento autoadesive rivestite di idrogel attraverso cui circola l'acqua a temperatura controllata. Quest'ultimo dispositivo peraltro si è dimostrato più efficace degli altri soprattutto nel trattamento di febbri elevate refrattarie.⁶²

Le tecniche *invasive*, invece, includono: lavaggi freddi nasali, rettali e naso-gastrici, sistemi di circolazione extracorporea (CPB o ECMO), flusso retrogrado giugulare, lavaggio peritoneale con scambi freddi, ipotermia cerebrale intraventricolare e infusioni intravenose fredde.

In particolare l'infusione di fluidi attraverso la via intravenosa si è dimostrata particolarmente tollerabile e fattibile anche in ambito pre-ospedaliero. Lo studio di Bernard et al ha da tempo inoltre documentato come soluzioni a 4°C di Ringer lattato per circa 30 ml/kg infusi

rapidamente diano un rapido calo della temperatura corporea (da 35,5°C a 33,8°C entro 30 minuti) senza effetti collaterali, in particolare senza segni di edema polmonare.⁶³ Tuttavia secondo un altro autore, Kliegel, questo metodo è sicuramente efficace nell'induzione ma non nel mantenimento della temperatura, per il cui scopo si necessita spesso di supporti ulteriori.⁶⁴ Ecco perché nella pratica clinica sarebbe utile l'associazione di più dispositivi: per un'induzione rapida sarebbero da preferire vie invasive ma più efficaci, mentre se si necessita di un mantenimento più lungo sarebbero da prendere in considerazione le vie non invasive visto anche il minor numero di effetti collaterali associati a questi dispositivi.

Per quanto riguarda la protezione cerebrale sappiamo che l'estensione del danno cerebrale è dato principalmente dalla durata dell'ischemia e 5 minuti sono la soglia limite tollerata. Per questa ragione si è stati portati a pensare da subito che l'ipotermia dovesse essere indotta il prima possibile. Non a caso le ultime indicazioni sulla durata complessiva dell'ipotermia raccomandano un tempo minimo di 12-24 ore.²³ Molti studi su cavie animali sono stati fatti negli anni e hanno dimostrato come più precocemente si induce l'ipotermia terapeutica, più velocemente si raggiunge il target di temperatura e maggiore è la possibilità di ottenere un outcome positivo. Anche un ritardo infatti di soli 15 minuti si è rivelato cruciale nel ridurre notevolmente le possibilità di un miglioramento dell'outcome anche se comunque ci sarebbe un effetto positivo nel rallentamento del danno cerebrale.⁶⁵ Molti Autori successivamente però hanno smentito questo dogma de "il prima possibile" dimostrando con i loro studi come anche un ritardo nel raffreddamento possa comunque portare a dei benefici.^{66,67,68}

Modi e tempi di induzione e mantenimento dell'ipotermia rimangono quindi tutt'oggi materia di discussione, di studio ed ancora in evoluzione.

APPLICAZIONI CLINICHE DELL'IPOTERMIA TERAPEUTICA⁶⁹

Rianimazione cardiopolmonare

I danni sia miocardici che cerebrali si prolungano anche molte ore dopo il successo della rianimazione in relazione soprattutto al danno da ischemia-riperfusione per cui prolungare per almeno 12-24 h il trattamento ipotermico si è dimostrato efficace e protettivo soprattutto se iniziato precocemente. Rimane ancora argomento di discussione se il suo utilizzo possa essere esteso oltre che ai pazienti rianimati dopo arresto cardiaco da ritmi defibrillabili anche a pazienti con PEA o asistolia che partono già da una prognosi sfavorevole. Non è quindi chiaro se i risultati meno eclatanti in questi pazienti siano legati alla situazione clinica di base peggiore o se effettivamente l'ipotermia non sia efficiente nel contrastare questi quadri.

Trauma cerebrale

Il trauma cerebrale è la causa più comune di morte e di disabilità nei giovani nei paesi occidentali. Mentre il danno primario avvenuto al momento del trauma è verosimilmente irreversibile, il danno secondario invece, che si sviluppa anche nell'arco di giorni, è potenzialmente prevenibile e trattabile. Questo danno è legato all'edema cerebrale, alla conseguente ipertensione endocranica, al ridotto flusso ematico dell'area lesa con ulteriore ischemia e rischio di ernie cerebrali che aumentano notevolmente il rischio di morte. In particolare, gli studi condotti hanno dimostrato una riduzione della pressione intracranica, mentre l'effetto netto sulla sopravvivenza e l'esito neurologico presenta ancora risultati contrastanti.

Stroke

Gli studi su animali indicano un chiaro beneficio dell'ipotermia in caso di stroke ma hanno anche dimostrato che la finestra temporale a disposizione per il trattamento ipotermico potrebbe essere più limitata rispetto a quello del danno post ischemico. In particolare, l'intervento terapeutico è volto a limitare i danni nella penombra ischemica. Fino ad ora ci sono solo esperimenti sugli animali e studi clinici preliminari che suggeriscono che l'ipotermia possa aiutare a limitare i danni neurologici nei pazienti con ictus ma non ci sono studi clinici controllati disponibili sull'uomo.

La febbre nei pazienti con danno neurologico

La febbre è molto comune nei pazienti neurologici in terapia intensiva, colpiti da ictus ischemico, trauma cranico, emorragia intracerebrale ed emorragia subaracnoidea ma anche dopo arresto cardiaco. È noto che la febbre può influenzare negativamente gli esiti neurologici e diversi studi hanno riportato peggiori esiti neurologici e una più alta mortalità nei pazienti che sviluppano febbre da cause non infettive.

Ipotermia intraoperatoria

L'ipotermia intraoperatoria è stata impiegata clinicamente fin dal 1950 da Bigelow et al. per consentire operazioni intracardiache in un campo esangue. Di solito, l'obiettivo dell'ipotermia intraoperatoria è di aumentare il tempo a disposizione per specifiche procedure chirurgiche, riducendo il metabolismo e conferendo protezione al cervello e/o al midollo spinale durante l'occlusione vascolare locale o arresto circolatorio completo. Attualmente l'ipotermia viene impiegata diffusamente in neurochirurgia, in chirurgia vascolare e in cardiocirurgia.

IPOTERMIA FARMACOLOGICA

Il percorso che negli anni si è intrapreso nello studio dell'ipotermia, ha portato ad approfondire le conoscenze riguardo i mediatori e le vie di signaling coinvolte nel meccanismo della termoregolazione. Per ovviare alle carenze del trattamento ipotermico attuale da qualche anno l'attenzione è rivolta proprio alla modulazione di queste vie attraverso mezzi farmacologici. In particolare, ci sono due classi di farmaci per ora maggiormente sperimentati, i cannabinoidi e gli attivatori dei recettori degli oppioidi. In corso di studio sono anche i transient receptor potential vanilloid, neurotensins, thyroxine derivatives, dopamine receptor activators, hypothermia-inducing gases, adenosine, and adenine nucleotides e colecistochinina.

DADLE E LA VIA DEGLI OPIOIDI

L'implicazione dei recettori degli oppioidi nella modulazione della temperatura è stata studiata mediante indagini volte ad identificare quel fattore plasmatico HIT (Hibernation-induction-trigger) responsabile dell'induzione dell'ibernazione negli animali. Le principali prove a sostegno del coinvolgimento del sistema degli oppioidi sono il risveglio dall'ibernazione con la somministrazione del Naloxone (antagonista del recettore degli oppioidi), e la capacità di un agonista del recettore degli oppioidi come il DADLE ((d-Ala²-d-Leu⁵)-enkephalin) di indurre uno stato di ibernazione.⁷⁰ In particolare l'utilizzo di DADLE conferma il coinvolgimento solamente del recettore δ degli oppioidi mentre il legame ai recettori κ e μ è inefficace.⁷¹

Numerose sono le evidenze che la stimolazione dei recettori δ -1 e δ -2 a livello cardiaco da parte del DADLE porta ad effetti cardioprotettivi mediante l'attivazione delle vie del preconditionamento ischemico. Gli effetti cardioprotettivi del preconditionamento sono ben noti e si manifestano con una riduzione delle dimensioni dell'infarto e un miglioramento della funzionalità post-ischemica con riduzione delle perdite di creatin-chinasi.

Il composto DADLE ha dimostrato attività neuroprotettrice in modelli animali di ischemia e riperfusion cerebrale. In un modello animale di occlusione dell'arteria cerebrale media è stato dimostrato come l'effetto neuro protettivo di DADLE si eserciti con l'attivazione della via trasduzionale PI3-Akt determinando una riduzione dell'apoptosi delle cellule nervose.⁷² Akt infatti stimola vie che determinano proliferazione e sopravvivenza cellulare, un'ulteriore studio dimostra come questa azione venga promossa dall'aumento dell'espressione di Bcl2

che possiede proprietà anti-apoptotiche.^{73,74} Le stesse proprietà sono state dimostrate in un modello di ischemia e riperfusione del midollo spinale nel coniglio.⁷⁵

WIN 55.212-2 E I CANNABINOIDI

È noto come i cannabinoidi producano una serie di effetti farmacologici negli animali e nell'uomo, tra cui anche l'ipotermia.⁷⁶ Lo studio dei cannabinoidi ha portato alla sintesi di numerosi agonisti sintetici tra cui il WIN 55.212-2 [(4,5-diidro-2-metil-4 (4-morfolinilmetil) - 1-(1-naftalenil-carbonil)-6H-pirrolo [3,2,1ij] chinolin - 6-one]. Questo farmaco si è rivelato molto potente ed efficace sia in vitro che in vivo producendo effetti analgesici e inducendo l'ipotermia negli animali da esperimento.^{77,78}

Dal punto di vista farmacologico WIN 55.212-2 ha maggiore specificità d'azione rispetto al cannabinoide naturale Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC). Infatti, al contrario di quest'ultimo che interagisce con numerosi sistemi neurorecettoriali, WIN 55.212-2 ha una selettività maggiore per i ligandi specifici dei cannabinoidi.⁷⁹

Dal punto di vista molecolare WIN 55.212-2 risulta più solubile rispetto al Δ^9 -THC, quest'ultimo estremamente idrofobo. Questa caratteristica ne permette la somministrazione in soluzione salina e non richiede l'uso di solventi come etanolo, un depressivo ad azione centrale che può alterare gli effetti neurochimici e comportamentali del farmaco.⁷⁶

Nella termoregolazione un importante ruolo è svolto dal nucleo anteriore dell'ipotalamo. Vari studi hanno dimostrato che i cannabinoidi inducono l'ipotermia a livello centrale agendo proprio in questa sede. Ci sono molte evidenze, infatti, che a livello ipotalamico risiedono numerosi recettori per i cannabinoidi di tipo CB1. Esistono, infatti, due sottotipi di recettori dei cannabinoidi: CB1, che si trova principalmente nel sistema nervoso centrale e che media gli effetti centrali dei cannabinoidi, e CB2, che si trova quasi esclusivamente nelle cellule immunitarie periferiche. La sintesi di antagonisti specifici per CB1 e CB2 ha permesso di comprovare ulteriormente il ruolo esclusivo di CB1 nell'indurre l'ipotermia, e di studiare il meccanismo d'azione di WIN 55.212-2.^{80,81} Questo farmaco si è dimostrato indurre l'ipotermia in modo dose-dipendente, confermando quindi un meccanismo recettore-mediato. Ulteriore prova di questa modalità d'azione è l'evidenza che il suo effetto viene vanificato da un antagonista del recettore CB1 o dalla delezione del gene per questo stesso recettore. Poiché quindi i recettori CB1 sono presenti principalmente nel SNC possiamo affermare che i cannabinoidi producono un effetto ipotermico centrale.⁸²

TECNICHE DI PROTEZIONE CEREBRALE DURANTE CHIRURGIA DELL'ARCO AORTICO

DHCA

I primi tentativi di raffreddamento senza CPB furono effettuati già nel 1940⁸³ ma questo approccio fu abbandonato a causa del pericolo di aritmie a temperature inferiori a 32°C. L'ipotermia fu riconosciuta come uno strumento chiave per il cardiocirurgo fin dall'era pionieristica¹⁵ infatti casi isolati in adulti utilizzando DHCA e CPB furono tentati già nel 1960 in interventi per aneurisma aortico.^{84,85}

In seguito, DHCA è stata utilizzata nella chirurgia dell'aorta come un'efficace tecnica di protezione cerebrale per più di tre decenni ed è stata perfezionata da Griepp e colleghi.⁸⁶ Sebbene l'ipotermia si sia dimostrata un mezzo utile per la protezione di qualsiasi organo, al momento dell'arresto di circolo, seppure in maniera rallentata inizia una cascata di eventi che porta al danno cellulare cerebrale.⁸⁷

DHCA ha dimostrato di essere un aiuto essenziale per i cardiocirurghi per facilitare l'esecuzione di procedure cardiache complesse in adulti e bambini, offrendo la possibilità di preparare un campo completamente esangue per permettere la visualizzazione dei grandi vasi senza la distorsione o danni causati da clamp vascolari e senza riempire eccessivamente il campo operatorio con cannule per la perfusione.^{88,89,90} Studi clinici hanno suggerito che, in ipotermia profonda e in assenza di perfusione cerebrale, 40-60 minuti rappresenta il tempo in cui il danno cerebrale rimane assente, oltre i 60 minuti il verificarsi di ictus risulta proibitivo.^{91,92}

Studi più accurati effettuati di recente che prevedevano l'utilizzo di test neuropsicologici hanno mostrato che la durata di DHCA più di 25 minuti e l'età avanzata sono risultati predittivi di scarso rendimento negli esami di memoria e della motilità funzionale fine.⁹³

Temperature troppo basse possono rendere il cervello suscettibile a un "danno da freddo" che si vede per temperature minori di 12°C. Per questo comunemente, i chirurghi utilizzano temperature tra i 12 e i 25°C durante DHCA⁹⁴, in realtà la maggior parte impiegano temperature comprese tra 18-19°C ma le prove a sostegno dell'efficacia maggiore di un particolare range di temperatura sono ancora controverse.^{95,96}

Dumfarth et al. hanno affermato che la sola ipotermia è sufficiente durante la chirurgia dell'arco aortico: nei pochi ictus che si sono verificati durante DHCA, la valutazione con TAC ha rivelato che due terzi erano di origine embolica piuttosto che dovuti a una mal protezione

cerebrale, mentre il restante terzo sembrava essere legato all'ipoperfusione. Il tempo medio di DHCA era di 31 min (range, 10-66 min), nei pazienti con tempi di DHCA che hanno superato i 40 minuti, il numero di ictus era aumentato in modo significativo al 13,1%.⁹⁷

Le preoccupazioni per l'aumento della mortalità e il rischio di deficit neurologico hanno portato alla realizzazione di nuove tecniche di protezione, come ACP e RCP, che potrebbero migliorare la sicurezza della DHCA.⁹⁸

Level of hypothermia	Temperature (°C)
Mild	35.9 – 33.0
Moderate	32.9 – 28.0
Deep (or Severe)	27.9 – 21.0
Profound	≤ 20.9

Tabella III: Denominazione del grado d'ipotermia secondo la temperatura.

Temperature (°C)	Brain Safe CA (min)
37 (normothermia)	5
30 (moderate)	8 – 10
25 (deep)	12 – 15
20 (profound)	17 – 24
15 (profound)	25 – 38
10 (profound)	36 – 62

Tabella IV: Periodo di arresto di circolo ritenuto sicuro in relazione al grado ipotermia.

ANTEGRADE CEREBRAL PERFUSION (ACP)

Con il termine ACP (antegrade cerebral perfusion) ci si riferisce alla perfusione del cervello con sangue ossigenato indipendentemente dal resto del corpo, a un flusso fisiologico di 10-20 ml/min e a una pressione di 40-50 mmHg. Ci sono diversi vantaggi nell'utilizzo di ACP, tra cui il suo potenziale di prolungare il tempo di sicurezza dell'arresto circolatorio, un migliore raffreddamento cerebrale, e la sua potenziale applicazione con ipotermia moderata invece di profonda. Il concetto di ACP durante chirurgia aortica è stato inizialmente presentato da DeBakey.⁹⁹ Nonostante il successo del trattamento di questo particolare paziente, i risultati negli anni successivi, utilizzando questa tecnica, sono stati deludenti ed è stata temporaneamente abbandonata. Anni dopo Bachet ha mostrato re-interesse nella perfusione anterograda modificandola con una perfusione cerebrale fredda in ipotermia.¹⁰⁰

Successivamente ACP è diventata il metodo di scelta per la protezione cerebrale durante interventi chirurgici sull'arco aortico in molti centri. Tuttavia, molti dettagli tecnici di ACP restano controversi, tra cui la scelta del sito di cannulazione, ACP uni o bilaterale, pressione di perfusione, e gestione della temperatura, in particolare, sia la temperatura ideale della soluzione di perfusione cerebrale sia la temperatura corporea rimangono una preoccupazione. Con l'introduzione negli interventi di chirurgia dell'arco aortico di ACP, l'ipotermia profonda sembra non essere più essenziale per la neuroprotezione; questo ha portato ad un crescente interesse nell'aumento della temperatura corporea durante l'arresto di circolo per evitare coagulopatia o disfunzione d'organo dopo il periodo esteso di CPB necessario per l'induzione dell'ipotermia profonda ed il lungo tempo di riscaldamento necessario dopo la fase centrale dell'intervento chirurgico.^{101,102,103}

Ci sono due principali opzioni chirurgiche per ACP: ACP non selettiva (NSACP) o ACP selettiva (SACP).

NSACP, o emisferica, si riferisce a cannulazione della sola arteria ascellare o dell'arteria anonima con la perfusione emisferica sinistra dipendente da un circolo di Willis competente. La tecnica di cannulazione dell'arteria ascellare sia per effettuare CPB sia per ACP durante l'arresto di circolo è stata resa popolare nel 1990 da Sabik et al. ed è ormai diventata una strategia molto usata tra coloro che eseguono questo tipo di interventi.¹⁰⁴

Vantaggi della cannulazione dell'arteria ascellare includono il suo uso come accesso per CPB e la relativa libertà dell'arteria ascellare da dissezione e da malattia aterosclerotica. Può quindi anche essere considerata più sicura¹⁰⁵ e più rapida rispetto alla cannulazione dei vasi epiaortici che potrebbero essere coinvolti nella patologia aortica.^{106,107,108} Le potenziali complicanze

della cannulazione dell'arteria ascellare includono flusso insufficiente, inadeguata perfusione dell'arto superiore destro, linfocele, e lesioni del plesso brachiale.

SACP comporta la cannulazione selettiva sia della carotide comune sinistra sia dell'arteria anonima, direttamente o tramite un innesto di tubo vascolare. SACP ha permesso ottimi risultati nella sostituzione totale dell'arco aortico e ridotto la mortalità e la morbilità periprocedurale, inoltre il tempo di SACP non sembra avere un impatto significativo sull'outcome dei pazienti.^{109,110}

Due studi non hanno sostenuto SACP come una strategia valida per la neuro protezione: Di Eusanio e collaboratori hanno studiato 588 pazienti che hanno avuto un intervento sull'aorta toracica utilizzando SACP, l'entità della riparazione aortica e del tempo di SACP non erano statisticamente correlati con un aumentato rischio di mortalità ospedaliera, disfunzione neurologica temporanea (TND) o permanente (PND)¹¹¹, inoltre gli inconvenienti di questo approccio includono il necessario isolamento chirurgico di questi vasi chiave, che può portare a lesioni vascolari od embolizzazione e l'aggiunta di cannule nel campo operatorio.¹¹²

Tuttavia molti altri studi relativi a SACP sono stati generalmente molto positivi e SACP è diventata la tecnica preferita di protezione cerebrale, poiché le altre tecniche non hanno fornito protezione cerebrale soddisfacente.^{113,114,115} Inoltre l'utilizzo di DHCA in associazione a SACP è stato trovato essere superiore alla sola DHCA nel prevenire lesioni cerebrali.¹¹⁶ Spielvogel conclude che la strategia di protezione cerebrale ottimale per la sostituzione totale dell'arco sembrerebbe essere SACP in ipotermia profonda.¹¹⁷

Halkos e colleghi, nel 2009, effettuano una revisione retrospettiva di 271 pazienti sottoposti a chirurgia aortica con DHCA con (n = 205) o senza (n = 66) SACP. La mortalità operatoria si è verificata nel 12,1% (33/271) dei pazienti: 8,8% (18/205) nei pazienti con SACP vs 22,7% (15/66), in quelli con sola DHCA (P = 0,003). TND si è verificato nel 5,9% (15/255) dei pazienti: 4,5% (9/198) nel SACP contro 10,5% (6/57) in DHCA (P = 0,09). Stroke si è verificato nel 4,3% (11/255) dei pazienti, senza differenze tra i gruppi. SACP è stata associata a una più breve permanenza nell'unità di terapia intensiva e minori tempi di ventilazione invasiva e ridotte complicanze renali e polmonari.¹¹⁸

Leshnower et al. hanno studiato retrospettivamente 344 pazienti sottoposti a ricostruzione dell'emiarco e 68 pazienti sottoposti a sostituzione totale dell'arco con cannulazione dell'arteria ascellare: la mortalità operatoria è stata del 7,0%, l'incidenza di PND e TND è stata rispettivamente del 3,6% e del 5,1%. In questo studio DHCA con NSACP non è risultata essere un predittore indipendente di mortalità, PND, TND o insufficienza renale richiedente la dialisi.¹¹⁹

L'ACP attraverso arteria ascellare offre protezione cerebrale e protezione degli organi viscerali almeno pari a quella di ACP bilaterale e potrebbe essere vantaggiosa nel ridurre l'incidenza di embolia derivante dalla manipolazione chirurgica sui vasi epiaortici. Il concetto di SACP per la chirurgia aortica utilizzando una perfusione a una temperatura di 30°C è descritto in uno studio di 2 istituti e può essere considerato sicuro, semplice e riproducibile e potrebbe aiutare a ridurre il tempo CPB e gli effetti collaterali ipotermia correlati.¹²⁰

In conclusione, la maggior parte degli studi suggeriscono l'utilizzo di ACP per i pazienti che necessitano di protezione cerebrale perché potrebbe fornire il lusso del tempo, permettendo la riparazione appropriata di complicati aneurismi dell'arco. La perfusione cerebrale e corporea attraverso l'arteria ascellare o femorale può fornire una migliore protezione per il cervello e gli organi viscerali e più tempo per il chirurgo, questo risulta particolarmente importante per i chirurghi durante la curva di apprendimento.

Raffreddamento topico

Il raffreddamento tramite perfusione fredda è soggetto ai limiti della circolazione cranica cerebrale ed extra cerebrale. Indipendentemente dalla temperatura del cervello desiderata, le condizioni ideali per avere un'adeguata protezione cerebrale in ipotermia profonda includono un'uniforme ipotermia cerebrale. Purtroppo, a causa delle condizioni anatomiche, della malattia vascolare, e dell'alterata vaso regolazione è improbabile ottenere in modo affidabile una completa e omogenea ipotermia cerebrale mediante la sola perfusione fredda. Per questo oltre alla perfusione fredda si può applicare del ghiaccio sulla testa in modo da ridurre la temperatura del cervello durante l'intervallo di DHCA.^{121,122}

Il marcatore più utilizzato per determinare un'adeguata protezione cerebrale è la temperatura. Durante l'ipotermia profonda, la cessazione dell'attività elettro-corticale è spesso identificata come un endpoint significativo in cui i benefici della soppressione metabolica sono sufficientemente equilibrati. Il silenzio elettro-corticale nell'uomo avviene a una temperatura nasofaringea media di 17,8°C e richiede un tempo di raffreddamento medio di 27,5 minuti.¹²³ Purtroppo, sia la temperatura sia il tempo di raffreddamento necessario per raggiungere il silenzio elettro-corticale sono molto variabili. Solo il 60% dei pazienti raggiunge il silenzio elettrocorticale a 18°C. Durante il raffreddamento c'è una graduale riduzione delle componenti veloci dell'EEG e un aumento delle componenti lente. Occasionalmente compaiono anche delle scariche rapide ripetitive. Durante l'arresto di circolo l'attività elettrocorticale si affievolisce sempre di più per poi ricomparire a un tempo variabile dopo il ripristino del flusso cerebrale. In generale dopo 20-30 minuti di riperfusione e riscaldamento

l'EEG ritorna a condizioni normali, questo probabilmente per l'importante debito di ossigeno riscontrato dal tessuto neuronale ed è influenzato dalla temperatura a cui viene effettuato l'arresto di circolo e dalla sua durata. Un tempo prolungato di ripristino dell'attività elettrocorticale è stato correlato a una peggior prognosi. Oltre alla temperatura e il monitoraggio elettroencefalografico, sono stati studiati altri marker fisiologici per guidare il riconoscimento di un cervello adeguatamente protetto, purtroppo, c'è solo una limitata evidenza a sostenere che questi marker possano essere affidabili.

Sebbene l'ipotermia topica abbia un'efficacia limitata, i suoi vantaggi sono i seguenti: non è limitata dalla circolazione cerebrale, il suo impiego non può causare eventi embolici o iperperfusioni, è poco costoso. A causa della capacità non provata della perfusione fredda di produrre un'adeguata e omogenea ipotermia cerebrale e l'incapacità degli attuali marker fisiologici di misurare definitivamente uno stato ottimale di protezione, l'aggiunta di un raffreddamento topico alla perfusione cerebrale fredda non può essere abbandonato.

RETROGRADE CEREBRAL PERFUSION (RCP)

Questa tecnica è stata proposta basandosi sul successo dell'uso di lavaggio retrogrado attraverso la vena cava superiore (SVC) dopo massiccia embolia gassosa durante CPB (Mills et al., 1980). Durante RCP, SVC è perfusa con sangue freddo (12-15°C) a bassa pressione (20-30 mmHg, 250-800 ml/min) con il sangue che refluisce dalla testa attraverso le arterie carotidi. Questo approccio è stato introdotto nella chirurgia dell'arco aortico da Lemole¹²⁴ e diffuso nel 1990 da Ueda.^{125,126} Ci sono molti potenziali vantaggi veri e teorici della RCP. La tecnica prevede l'opportunità di un accurato de-airing dei vasi dell'arco. Il raffreddamento cerebrale è facilitato e comporta anche l'eliminazione delle tossine, può anche rimuovere emboli dai rami arteriosi dell'arco. Infine, evita la manipolazione dei vasi epiaortici ateromatosi e consente la rimozione di alcune cannule dal campo operatorio fornendo flusso sufficiente a sostenere il metabolismo cerebrale, e mantenendo un'adeguata ipotermia.^{127,128,129}

Sebbene RCP abbia un importante ruolo nell'espellere gli emboli di aria, è ora noto che la pressione necessaria per questo provoca edema cerebrale e può aggravare il danno cerebrale.^{130 131} Altro svantaggio potrebbe derivare dalle scarse prove che il sangue raggiunga il target cerebrale; il sangue di ritorno all'arco aortico è solo dal 3% al 10% della quantità data attraverso la cannula di perfusione retrograda, più del 90% viene deviato attraverso azygos alla SVC o intrappolata nei seni venosi cerebrali.^{132,133}

IPOTERMIA ACCIDENTALE

Un aspetto complementare all'ipotermia indotta è quella che insorge per cause accidentali. L'ipotermia accidentale è presente ad ogni latitudine ed in ogni stagione, tuttavia è più comune in contesti urbani, dove senz'altro, abuso di alcol e sostanze e disordini psichiatrici spesso coesistono.¹³⁴ Si possono riconoscere un'ipotermia accidentale primitiva o acuta, derivante dall'esposizione al freddo o dall'immersione in acqua fredda di un individuo precedentemente sano, e un'ipotermia accidentale secondaria o cronica, complicanza di una malattia sistemica grave, la cui mortalità è maggiore rispetto alla precedente.¹³⁵ Esistono numerose variabili che rendono gli individui vulnerabili alla perdita di calore, prime fra tutte le età estreme. La percezione termica diminuisce negli anziani, i quali sono più soggetti ad immobilità, malnutrizione, malattie sistemiche, oltre che demenza e malattie psichiatriche, che interferiscono con la produzione e la conservazione del calore. D'altra parte, i neonati presentano elevata perdita di calore corporeo a causa dell'elevato rapporto fra superficie e massa corporea, oltre che dalla mancanza di un efficace riflesso del brivido e di risposte comportamentali adattative.¹³⁶ Variabili endocrinologiche possono inoltre essere responsabili della comparsa di ipotermia. L'ipotiroidismo, soprattutto nei gravi casi in cui viene raggiunto il coma mixedematoso, determina una riduzione del metabolismo basale e ostacola la termogenesi. Altre condizioni con effetti simili sono l'insufficienza surrenalica e l'ipopituitarismo. In soggetti affetti da diabete l'ipotermia può manifestarsi in conseguenza di ipoglicemia, chetoacidosi diabetica o acidosi lattica. A livello neurologico possono agire da fattori predisponenti sia lesioni cerebrali (traumi, accidenti cerebrovascolari, emorragie subaracnoidee o lesioni ipotalamiche), sia lesioni midollari (blocco dell'impulso nervoso simpatico responsabile dell'induzione del brivido e della vasocostrizione sistemica).

Per quanto riguarda il ruolo svolto da fattori esogeni, l'etanolo provoca vasodilatazione, riduce la termogenesi e la gluconeogenesi, oltre a limitare la capacità di giudizio; le fenotiazine, i barbiturici, le benzodiazepine, gli antidepressivi triciclici e molti altri inducono vasocostrizione mediata dal sistema nervoso centrale; gli anestetici bloccano la reazione del brivido. Quale che sia l'eziologia alla base dello sviluppo di ipotermia, la presenza di sepsi è un importante segno prognostico negativo.

Per comprendere il ruolo di queste disfunzioni d'organo nello sviluppo di ipotermia bisogna fare riferimento al ruolo svolto dagli stessi nella termoregolazione e nella risposta adattativa ad alterazioni della termoneutralità. L'ipotalamo anteriore (regione preottica) è l'attore principale dei meccanismi alla base della termoregolazione. All'attivazione iniziale di questi

sistemi, segue una depressione progressiva di tutti gli organi e apparati, che avviene con cinetica variabile.

A differenza di quanto avviene per l'ipotermia indotta, in quella accidentale sono presenti una serie di fattori che possono influenzare la velocità con cui si verifica il raffreddamento, e questi sono rappresentati da massa corporea, età, isolamento (indumenti e grasso sottocutaneo), brivido, movimenti, gradiente di temperatura, percentuale di superficie a contatto con un mezzo freddo e condizioni locali, quali il vento e la turbolenza dell'acqua in caso di annegamento. Il fattore cruciale in ogni caso è se l'ipossia cerebrale critica si sia verificata prima che il raffreddamento protettivo si sia instaurato.¹³⁷ L'ipotermia precoce è la principale ragione per cui è possibile sopravvivere senza che si sviluppino danni neurologici. Nei bambini la sopravvivenza nei casi di ipotermia da immersione è addirittura migliore, per via della maggior rapidità con cui avviene il raffreddamento rispetto agli adulti, soprattutto nei neonati. È addirittura probabile che l'aspirazione di acqua fredda nei bambini possa determinare un immediato raffreddamento del cuore e delle arterie carotidi, e di conseguenza del cervello.¹³⁸ In linea generale, la durata della sommersione (testa sott'acqua) è una misura diretta del danno anossico: una durata di 2,5-5 minuti predice esiti positivi, >10 minuti è associata ad esiti negativi, mentre con una durata superiore a 25-30 minuti le possibilità di sopravvivenza sono praticamente nulle. Nel caso delle vittime di valanghe la velocità di raffreddamento è estremamente variabile, ma anche in questo caso la sopravvivenza decresce in modo drammatico dopo 35 minuti. Se questi soggetti sono trovati in arresto cardiaco gli esiti sono estremamente scarsi, anche se sottoposti a ECLS per il riscaldamento.¹³⁹ Tuttavia, esistono report sempre più estremi di sopravvivenze (con qualità della vita ottima) dopo molti minuti di arresto ipotermico accidentale.^{140,141}

Management iniziale

La diagnosi è relativamente semplice se l'individuo presenta in anamnesi un'esposizione prolungata all'ambiente esterno, a basse temperature, senza indumenti adeguati; risulta invece più complessa qualora si verifichi un'ipotermia accidentale secondaria, in un contesto clinico non ben conosciuto. L'ipotermia è confermata dalla misurazione della temperatura centrale in almeno due sedi. I possibili siti che possono essere utilizzati, in ordine decrescente di invasività sono l'arteria polmonare, l'esofago, la vescica, il retto, la membrana timpanica, la cavità orale e la cute. Generalmente si utilizzano una sonda rettale, posta ad almeno 15 cm di profondità, ed una esofagea, inserita fino a 24 cm al di sotto della laringe.¹³⁶

L'ipotermia accidentale è stadiata utilizzando come parametri la temperatura centrale misurata e i ritrovamenti clinici (Tabella V).¹⁴²

<i>Stadi</i>	<i>Rilevamenti clinici</i>	<i>T° centrale</i>
HT I (lieve)	Coscienza conservata, brivido	35-32° C
HT II (moderata)	Coscienza alterata, con o senza brivido	28-32° C
HT III (severa)	Soggetto incosciente, segni vitali presenti	<28° C
HT IV (severa)	Morte apparente, segni vitali assenti	variabile

Tabella V: *Stadi dell'ipotermia accidentale.*

Nei pazienti ipotermici che hanno sviluppato un arresto cardiaco sono numerosi i fattori che possono influire sugli esiti: l'ipossia (il singolo fattore più importante); caratteristiche del paziente (età, comorbidità, trauma, ecc); velocità del raffreddamento; ambiente (vento, acqua, neve); caratteristiche dell'arresto stesso (temperatura corporea, se l'ipossia ha preceduto l'arresto, ritardo nell'istituzione della rianimazione cardiopolmonare, velocità del trasferimento in ospedale); prossimità di struttura ospedaliera adeguata; appropriata preparazione dello staff ospedaliero.¹⁴³ Quasi sempre questi soggetti richiedono una CPR (cardiopulmonary resuscitation) prolungata. La NIRS (near-infrared spectroscopy) è sempre più utilizzata per monitorare la saturazione d'ossigeno cerebrale a livello regionale, e per predire il ROSC e gli eventuali esiti neurologici, sebbene le evidenze siano ancora scarse.¹⁴⁴ L'utilizzo di vasopressori sembrerebbe essere associato a miglioramenti nel ROSC, ma non a migliori esiti neurologici, che sarebbero addirittura peggiori in associazione all'utilizzo di dosi maggiori di adrenalina.¹⁴⁵ Le linee guida ERC del 2015 raccomandano di evitare la somministrazione di adrenalina nell'arresto cardiaco ipotermico e di limitare la defibrillazione a tre tentativi fino al raggiungimento dei 30°C.¹⁴⁶ In contrasto le linee guida dell'American Heart Association permettono ulteriori tentativi in associazione ai tentativi di riscaldamento e considera ragionevole la somministrazione di adrenalina in accordo allo standard degli algoritmi ALS.¹⁴⁷

In ogni caso, pazienti con instabilità emodinamica o arresto cardiaco dovrebbero essere trasportati il prima possibile in centri forniti di supporto ECLS, i quali devono essere contattati per tempo in modo tale da garantire la corretta organizzazione dell'assetto clinico prima che il paziente venga accolto (Figura 3). Inoltre, durante il trasferimento, deve essere garantita la continuità della CPR.

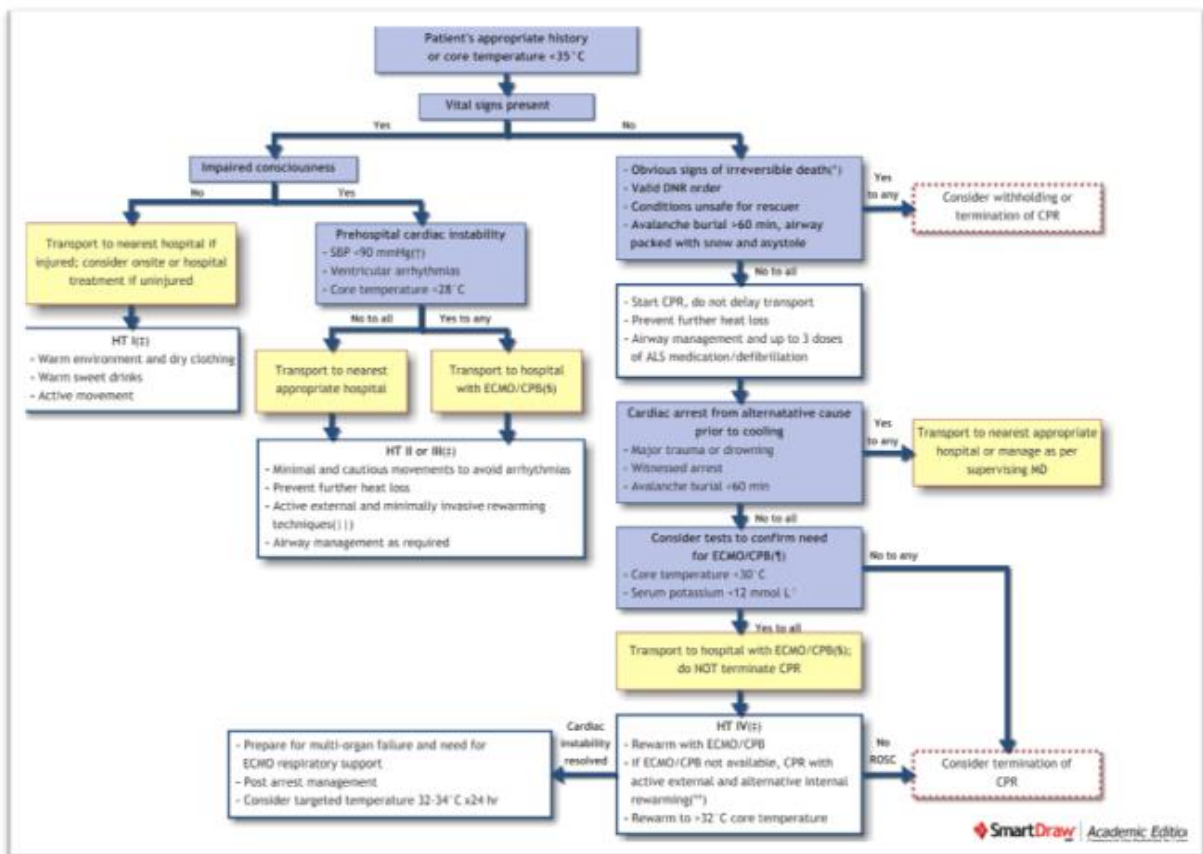


Figura 3: *Management in corso di ipotermia.*

Riscaldamento in ambiente ospedaliero

Dopo le prime manovre rianimatorie, una volta giunti in ambiente ospedaliero, è possibile mettere in atto una serie di strategie volte ad ottenere il riscaldamento. Queste possono essere classificate in passive (che consistono nella protezione dall'ulteriore perdita di calore), attive esterne (in cui il calore viene fornito attraverso la superficie corporea), e attivo interno (il calore è immesso direttamente all'interno del corpo). Il riscaldamento passivo consiste semplicemente nel coprire e isolare il paziente in un ambiente caldo: coprendo anche la testa si raggiunge una velocità di riscaldamento di 0,5-2° C l'ora. Questa è la tecnica migliore in pazienti precedentemente in buona salute, andati in contro ad ipotermia acuta, lieve, primitiva e accidentale. Dovrebbe invece essere evitata l'applicazione di calore direttamente alle estremità, per evitare l'instaurarsi di una vasodilatazione periferica e quindi di precipitare l'effetto "postcaduta" della temperatura centrale, in cui si verifica una continua caduta della temperatura anche dopo la cessazione dell'esposizione al freddo. Applicando calore anche al tronco questo fenomeno può essere prevenuto o quantomeno ridotto. Il riscaldamento

centrale, invece, è necessario quando la temperatura è al di sotto dei 32° C, quando vi è instabilità cardiovascolare, nelle età estreme, in presenza di alterazioni funzionali del SNC o di insufficienza endocrina, oltre che nei sospetti di ipotermia secondaria.

Il riscaldamento esterno attivo è realizzato mediante coperte termiche ad aerazione forzata, o in alternativa con strumenti che permettono la circolazione di acqua calda attraverso superfici esterne che scambiano calore, l'uso di sorgenti di calore radiante o di impacchi caldi. Il riscaldamento centrale attivo è rappresentato dal riscaldamento delle vie respiratorie con ossigeno umidificato e riscaldato (a 40-45° C) mediante una maschera o un tubo endotracheale; soluzioni di cristalloidi riscaldate a 40-42° C, la cui efficacia è garantita tuttavia solo dalla somministrazione di grandi volumi di liquidi; l'irrigazione gastrointestinale o della vescica con liquidi riscaldati, o ancora il lavaggio toracico chiuso, di gran lunga più efficace nei pazienti gravemente ipotermici, e il lavaggio peritoneale con dializzato a 40-45° C. Infine, l'ECLS che utilizza l'ossigenazione extracorporea a membrana per via arterovenosa (VA-ECMO) o il CPB rappresentano il trattamento di scelta da utilizzare in caso di arresto cardiaco ipotermico o grave instabilità circolatoria non responsiva alle tecniche ALS.

Trattamento con ECLS: VA-ECMO tecnica gold standard

L'ECLS è una metodica sicura, e con tassi di sopravvivenza superiori a tutte le altre metodiche. Essa, infatti, ristabilisce immediatamente la circolazione, provvede all'ossigenazione tissutale e alla rimozione di CO₂ e garantisce un riscaldamento rapido e controllabile.¹⁴³

La maggior parte dei pazienti in ipotermia primaria conservano un ritmo in grado di garantire la perfusione fino ai 28° C, di conseguenza le indicazioni all'utilizzo di ECLS in pazienti arrestati ma con temperatura centrale compresa tra i 28° e i 32° C sono più controverse, dal momento che è molto probabile che l'arresto cardiaco sia legato a cause diverse dall'ipotermia, e di conseguenza i benefici sugli esiti neurologici sarebbero meno marcati. L'utilizzo dell'ECLS in pazienti HT III (quindi non ancora in arresto cardiaco) può essere considerata in determinate situazioni: I) in caso di fallimento del riscaldamento con altri metodo meno invasivi; II) in presenza di aritmia rischiosa per la vita; III) ipotensione (pressione sistolica <90 mmHg); IV) insufficienza respiratoria; V) acidosi refrattaria. Anche pazienti anziani, con una tolleranza limitata allo stato di bassi flussi tipico dell'ipotermia severa, possono giovare del trattamento con ECLS.¹⁴⁸

Attualmente, tra le varie metodiche disponibili quella privilegiata è l'ECMO, ed in particolare la sua variante veno-arteriosa. L'ECMO è un sistema nato come terapia ponte in soggetti con

insufficienza respiratoria e/o cardiocircolatoria. Durante la procedura il sangue viene drenato dal sistema vascolare del paziente, fatto circolare all'esterno del corpo tramite una pompa meccanica, quindi reintrodotta all'interno della circolazione. Mentre si trova all'esterno, il sangue passa attraverso un ossigenatore ed uno scambiatore di calore. All'interno dell'ossigenatore l'emoglobina viene completamente saturata con l'ossigeno, mentre l'anidride carbonica è rimossa. I due tipi principali di ECMO sono quello veno-venoso (VV) e quello veno-arterioso (VA).

Le ragioni che portano a prediligere questo sistema rispetto ad altre tecniche di riscaldamento extracorporeo sono la rapidità con cui può essere posizionato, la minor necessità di eparinizzazione rispetto al CPB e la possibilità di prolungare il supporto cardiorespiratorio se necessario, considerato di fatto il vantaggio più significativo. Una serie di studi retrospettivi, inoltre, ha evidenziato un miglior tasso di sopravvivenza con questa tecnica.¹⁴⁹ La via più rapida per istituire la VA-ECMO è tramite la cannulazione di arteria e vena femorale. È necessario fornire l'anestesia generale, atta ad impedire che il paziente si risvegli, ed iniziare il riscaldamento con una temperatura di circuito approssimativamente uguale a quella del paziente all'ammissione, per evitare gradienti eccessivi.¹⁵⁰ Anche i flussi dovrebbero essere aumentati gradualmente, per evitare la formazione di bolle d'aria e il danno cellulare indotto dall'ischemia-riperfusion. Velocità di riscaldamento normalmente utilizzate variano tra 1° C ogni 5 minuti e 1° C ogni ora a seconda delle situazioni, tuttavia il tasso ottimale non è ancora conosciuto. La ventilazione deve essere iniziata non appena l'ECLS ha inizio. Il supporto circolatorio deve essere garantito fino a che non viene recuperato un ritmo stabile, un'adeguata perfusione ed ossigenazione spontanea ed una temperatura centrale >32° C. Fondamentale è cercare di evitare l'ipertermia post-rianimazione. Inotropi e vasopressori possono essere impiegati al momento dello svezzamento, mentre l'interruzione dell'ECMO può essere presa in considerazione se non si verifica ROSC a 32-25° C, oltre che sulla base di valutazioni cliniche, come la presenza di emorragia incontrollabile, eziologia diversa alla base del CA o severo danno ipossico cerebrale.

1.3.2 ALM (Adenosina-Lidocaina-Magnesio)

Con l'intento di sviluppare farmaci ad effetto neuro protettivo diversi composti sono stati creati e studiati tra questi esiste un composto chiamato ALM formato da tre molecole: Adenosina, Lidocaina e Magnesio.

ADENOSINA

“L'adenosina è un possibile agente cardioplegico grazie alle sue proprietà inibenti sul tessuto nodale”. Così scrivevano nel 1989 Schubert et al. a seguito del loro confronto tra la capacità dell'adenosina di indurre arresto cardiaco e di favorirne il recupero post arresto rispetto all'impiego di soluzione iperkaliemica.¹⁵¹ In tale studio l'adenosina si rivelava più efficace del controllo ed anche dell'associazione fra i due.

Da tempo ormai l'adenosina era impiegata in ambito medico e il suo studio era iniziato già agli inizi del '900.

Nel 1929 Drury e Szent-Gyorgyi evidenziarono come una sostanza, in seguito isolata ed identificata nell'adenilato, era capace di ridurre la frequenza cardiaca ed arrestare fibrillazione atriale indotta sperimentalmente.¹⁵²

Controverso in quel periodo appariva però l'impiego in ambito terapeutico. Già l'anno successivo Honey et al. ne confermavano l'effetto bradicardizzante, questa volta sull'uomo, ma ne riferivano il fallimento nella risoluzione della fibrillazione atriale.¹⁵³

Il pieno riconoscimento delle proprietà antiaritmiche si raggiungerà solo negli anni '50 grazie all'efficace impiego in 214 casi di tachicardia sopraventricolare parossistica.¹⁵⁴

L'adenosina possiede una funzione regolatrice a livello sistemico: i suoi livelli extracellulari aumentano in seguito al consumo energetico delle cellule; tale aumento attesta quindi elevato consumo ed origina un segnale, mediato da appositi recettori, che determina aumento del flusso ematico e riduzione del metabolismo. In questa maniera si sviluppa un circuito a feedback negativo che equilibra apporto e richiesta d'ossigeno. Per tal ragione l'adenosina viene definita “retaliatory metabolite”.¹⁵⁵

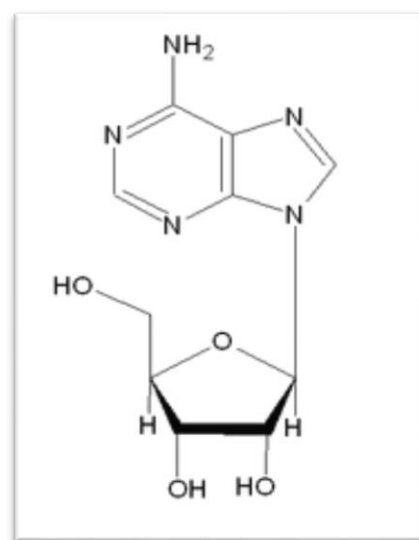


Figura 4: Adenosina. Adenina legata allo zucchero pentoso ribosio tramite legame β -N9-glicosidico.

L'adenosina è un nucleoside formato dalla base azotata purinica adenina e da uno zucchero pentoso. I suoi effetti di signaling vengono mediati ad opera di almeno 4 recettori situati su diversi tipi cellulari in tutto l'organismo. Si tratta di recettori associati a proteine G, nello specifico A1 e A3 sono associati a Gi/Go, proteine inibitrici che determinano riduzione dei livelli di cAMP, e talvolta Gq, attivante la fosfolipasi C, mentre i sottotipi A2a e A2b sono associati a Gs che determina al contrario innalzamento dei livelli di cAMP mediante attivazione della adenilato ciclasi con conseguente attivazione della PKA (cAMP dependent proteine kinase). L'adenosina viene prodotta a livello sia intracellulare che extra cellulare. Nella cellula dalla degradazione dell'AMP ad opera dell'enzima 5'-nucleotidasi, al di fuori di essa da enzimi come ecto-nucleotidasi e ecto-fosfodiesterasi del cAMP che agiscono rispettivamente sull'ATP e sull'cAMP.¹⁵⁶ Le sue concentrazioni extracellulari dipendono principalmente da due famiglie di trasportatori: gli ENTs (equilibrative nucleosides transporters) e gli CNT (concentrative nucleosides transporters). I primi consentono un trasporto passivo fra i due lati della membrana plasmatica mentre i secondi sfruttano il gradiente del Na per concentrare il nucleoside. Nel plasma l'emivita dell'adenosina è estremamente breve, minore di 10 sec, per azione sia della deaminazione ad inosina sia dell'uptake eritrocitario.

Numerose le attività dell'adenosina. Nel cervello è coinvolta nel rilascio di neurotrasmettitori, nella protezione dall'ischemia e nella plasticità sinaptica. Importante modulatore delle resistenze periferiche del sistema cardiovascolare e coinvolto nel metabolismo dei singoli organi. Influenza i leucociti modulandone attivazione e produzione di citochine. Nel polmone è mediatore di broncocostrizione e nel tessuto adiposo inibisce la lipolisi.

All'adenosina si attribuisce ruolo protettivo anche a livello cerebrale. In tale sede sono presenti tutti e 4 i sottotipi recettoriali noti, con importante prevalenza di A1AR e A2aAR. I valori extra cellulari cerebrali sono tendenzialmente nell'ordine delle nanomoli ma aumentano considerevolmente in condizioni di stress come in seguito ad ischemia/riperfusion e attacchi epilettici. Studiando colture cellulari ippocampali, e sottoponendole a stress di natura ipossica o ipoglicemica, si evidenziò come l'impiego di agonisti A1 (cicloesiladenosina) proteggeva i neuroni laddove l'esposizione a teofillina (antagonista dei recettori adenosinergici) ne aumentava il danno.¹⁵⁷ Aspetto interessante è che in un altro studio la somministrazione cronica di teofillina appariva protettiva, probabilmente per up regulation di A1AR. A1R esercita le sue funzioni protettive sia a livello presinaptico che post-sinaptico.¹⁵⁸ Nella pre-sinapsi l'adenosina riduce il flusso di Ca^{2+} attraverso canali del calcio voltaggio dipendente ed in tal modo riduce il rilascio di amminoacidi eccitatori come il glutammato. A livello post-

sinaptico determinano iperpolarizzazione mediante attivazione di canali del potassio e riducendo così l'attivazione di canali del calcio voltaggio dipendenti e complessivamente i livelli di calcio intracellulare. Stimolazione a basse dosi con A2aAR agonisti conferisce neuroprotezione contro la sofferenza ischemica ma tale protezione non è più presente per alte dosi.¹⁵⁹ Sono più promettenti gli antagonisti di A2aAR. Evidenze poi confermate da studi su topi knock-out per il gene di A2aAR evidenziavano complessivamente un ruolo negativo del recettore nella genesi del danno.¹⁶⁰ Che l'attivazione di A2aAR non fosse in definitiva benefica viene poi confermato da studi di comparazione che evidenziarono come l'attivazione del sottotipo A2a determini riduzione della protezione offerta dall'A1.¹⁶¹

LIDOCAINA

La lidocaina è un farmaco ampiamente impiegato nella pratica clinica come anestetico locale ed agente antiaritmico. Scoperta diversi anni fa, origina dalla fortuita sintesi di un composto anestetizzante nel corso di studi sugli effetti antiparassitari (primi anni '30) dell'alcaloide gramina.

La lidocaina è un'ammide, costituito da

un anello aromatico dimetilato collegato per mezzo di una catena intermedia ad una ammina terziaria. Deve il suo effetto all'interazione con i canali del sodio voltaggio dipendenti. Questi sono ampiamente rappresentati sulle cellule nervose e muscolari. Sono costituiti da tre sub unità: α , β_1 e β_2 . La sub unità α costituisce di per sé il canale mentre le altre svolgono un ruolo di regolazione.

Come quasi tutti gli altri anestetici locali il recettore della lidocaina si trova sul versante citoplasmatico del canale del sodio. Nello specifico il recettore diviene disponibile quando il gate di attivazione, in seguito alla depolarizzazione della membrana, si sposta nella conformazione attivata. La necessaria attivazione del canale per l'esposizione del sito di legame, spiega il perché gli anestetici locali siano più efficaci in quei tessuti che depolarizzano più frequentemente, come ad esempio le cellule nervose.

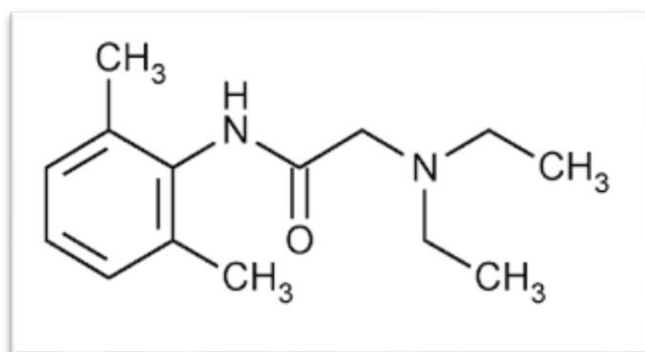


Figura 5: 2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl) acetamide, meglio noto come lidocaina (o lignocaina, xilocaina)

La lidocaina viene correntemente impiegata come anestetico locale e come antiaritmico. Le proprietà anestetiche sono sfruttate per indurre blocchi nervosi, infiltrazioni sottocutanee intra e peri-articolari e anestesia di superficie.

Secondo la classificazione di Vaughan-Williams la lidocaina è un antiaritmico di classe 1b. Influisce sul potenziale d'azione dei miocardiociti non specializzati riducendone la pendenza e l'ampiezza della fase 1. Si determina complessivamente un rallentamento nella conduzione dell'impulso (effetto dromotropo negativo). Questo effetto risulta protettivo contro aritmie da rientro; in particolare è indicata per le tachicardie ventricolari stabili mono e polimorfe. A differenza di altri antiaritmici (come le classi 1A e 3) la lidocaina non determina allungamento del tratto QT e conseguentemente non aumenta il rischio di tachicardia ventricolare polimorfa. È molto efficace nelle tachiaritmie ventricolari in cuore ischemico¹⁶² mentre è controverso il possibile impiego profilattico.^{163,164,165}

La lidocaina appare capace di proteggere il miocardio dall'insulto ischemico, riducendo l'area infartuata fin del 27% in esperimenti su cuore di topo.¹⁶⁶ La riduzione deriverebbe da un'attività anti-apoptotica del farmaco piuttosto che da una depressione della risposta immunitaria che si instaura in sede ischemica.

Anche a livello cerebrale la lidocaina esercita effetti protettivi mantenendo la capacità di modulare e ridurre il processo apoptotico. Studi in campo animale evidenziano come l'infusione di lidocaina sia capace di ridurre l'ampiezza dell'area infartuata in modelli sperimentali con legatura della arteria cerebrale media.^{167,168} Proprietà protettive testimoniate anche da studi sull'uomo in cui se ne valutava l'efficacia nel corso di operazioni cardiocirurgiche.^{169,170} Opportuno notare come l'effetto protettivo appare evidente e significativo quando l'infusione inizia prima dell'ischemia.¹⁷¹ Così come associata ad inibizione dell'apoptosi nei neuroni così la lidocaina ne è anche associata all'induzione. Numerosi studi, originatisi da case reports degli anni '90 evidenziano come la lidocaina possa causare morte programmata attraverso, almeno, la via intrinseca mitocondriale.^{172,173,174} Indubbiamente l'influenza della lidocaina sul processo apoptotico, in ragione della sua importanza centrale nella fisiopatologia di numerosi processi patologici, necessita di essere approfondita.

MAGNESIO

Il magnesio (Mg^{2+}) è per concentrazione il quarto catione dell'organismo ed il secondo a livello intracellulare dopo il Potassio (K^+). Coinvolto in centinaia di processi enzimatici, agisce anche come stabilizzatore cellulare, regola i processi di crescita e, essendone antagonista, modula tutti i processi in cui è coinvolto il Ca^{2+} come eccitabilità cardiaca, la trasmissione nervosa e la pressione sanguigna.¹⁷⁵ Nel corso degli anni sempre più evidenze ne testimoniano l'effetto positivo in ambito cardiovascolare (è protettivo contro infarto miocardico e ictus) endocrinologico (si è osservata associazione fra insulino resistenza e bassi livelli di Mg^{2+} e supplementi dietetici appaiono protettivi) nell'ipertensione (il Mg^{2+} riduce il tono vascolare e bassa concentrazione ematica aumenta la reninemia) e nella dislipidemia (si è osservata riduzione dei livelli di β -lipoproteine dopo somministrazione intramuscolare di $MgSO_4$ e bassa magnesemia è associata a maggior ossidazione delle lipoproteine). Numerosi sono gli impieghi del minerale: previene e cura pre-eclampsia ed eclampsia, è un efficiente antiaritmico impiegato per via endovenosa contro le torsioni di punta e studi ne evidenziano l'efficacia anche nella fibrillazione atriale, può essere efficace nell'asma, nelle cefalee ed è ampiamente utilizzate per disturbi del tratto digerente come reflusso gastroesofageo (antiacido) e come lassativo.

Il magnesio si è rivelato efficace anche in ambito cardioplegico. Nel '96 Shakerinia confrontò l'infusione di soluzione cardioplegica contro controllo magnesio-privo ed evidenziò come nel post-operatorio si osservasse una minore sofferenza ischemica e minore incidenza di aritmie ventricolari¹⁷⁶ quando il magnesio veniva utilizzato.

Studi sull'uomo ne confermano invece l'efficacia nell'ambito della neuroprotezione sia sul feto pretermine (in cui si riduceva l'incidenza di paralisi cerebrale)¹⁷⁷, nel corso di operazioni cardiocirurgiche¹⁷⁸ ed in seguito ad arresto cardiaco accidentale.¹⁷⁹ Chan et al, in studio del 2005, evidenziarono come l'infusione di solfato di magnesio ($MgSO_4$) risultasse protettivo nei confronti dell'inevitabile ipossia tissutale che si sviluppa durante le operazioni su aneurismi cerebrali che richiedano temporanea occlusione dell'arteria cerebrale media. Tale azione pare dipendere dal suo effetto di vasodilatante arteriolare.¹⁸⁰ Ricerche sugli animali confermavano già da tempo la neuroprotezione offerta dal magnesio. Questa dipenderebbe non solo dall'effetto vasodilatante, ma anche da un effetto diretto sui neuroni. Infondere magnesio si opporrebbe all'attivazione dei recettori NMDA, opponendosi all'eccitotossicità da glutammato, antagonizzerebbe il flusso di calcio attraverso i suoi canali voltaggio dipendente (riducendone i livelli intracellulari) e favorirebbe la rigenerazione dell'ATP.¹⁸¹

EFFETTI DI ALM

Adenosina, lidocaina e magnesio. Tre farmaci con doti cardio- e neuro-protettive. In tempi recenti si è deciso di valutarne la combinazione. Per anni l'esigenza di aver una campo operatorio esangue per le operazioni a cuore aperto aveva imposto lo sviluppo di soluzioni cardioplegiche che inducessero una arresto cardiaco controllato. Questa esigenza trovò risposta nello sviluppo delle soluzioni depolarizzanti iperkaliemiche. Tramite l'infusione di soluzioni con $[K^+] > 15 \text{ mEq/L}$ si determina progressiva depolarizzazione dei miocardiociti. L'elevazione delle concentrazioni extra-cellulari dello ione determina depolarizzazione dai circa -85 mV ai circa -50 mV . Ciò determina inattivazione dei canali del sodio voltaggio dipendenti rapidi ai quali si deve la rapida depolarizzazione del potenziale d'azione e quindi la non stimolabilità dei tessuti.

Indubbiamente efficaci, la cardioplegia iperkaliemica ha rappresentato l'inizio di un'era in cardiocirurgia. D'altro canto essa è gravata da una serie di complicanze: nello stato depolarizzato, nonostante l'inattivazione della maggior parte dei canali del sodio voltaggio dipendenti, permane comunque una permeabilità sufficiente a determinare innalzamento di $[Na^+]_i$ cui consegue inversione direzionale dello scambiatore Na/Ca . Eventuale ischemia con conseguente acidosi amplifica il processo mediante scambiatore Na^+/H^+ . Ne consegue aumento dei livelli di calcio intracellulari. Altro effetto deleterio è la vasocostrizione indotta dalle soluzioni iperkaliemiche. È causata da depolarizzazione a livello del muscolo liscio coronarico e a livello endoteliale (i due sono infatti collegati elettricamente); inoltre causa minor produzione di fattori vasodilatanti come NO e prostaglandine. Ne consegue variabilità e disomogeneità nella perfusione cardioplegica. In aree di tessuto miocardico, soprattutto a livello sub-endocardico, la protezione può risultarne sub-ottimale. Elevate concentrazioni di potassio, già per valori $> 10 \text{ mEq/L}$, danneggiano l'endotelio e promuovono attivazione piastrinica ed adesione neutrofila; quindi hanno effetto pro-infiammatorio con produzione di radicali liberi dell'ossigeno e alterazioni della coagulabilità. Complessivamente pare che le soluzioni iperkaliemiche siano la causa dell'ostruzione del 16-25% dei by-pass coronarici con safena.

Alterazioni elettrolitiche, e fra queste in particolare quelle del potassio, determinano importante aumento del rischio aritmico. Le cellule miocardiche sono sensibili in maniera differente alla cardioplegia iperkaliemica (atri>ventricoli>fibre del Purkinje> Nodo atrio-ventricolare>nodo seno-atriale), questa differenza d'azione determina eterogeneità elettriche. Le aritmie rappresentano una frequente conseguenza degli interventi in cardioplegia. Si

consideri che l'incidenza post-CABG per fibrillazione atriale è del 30% e può giungere sino al 69% per altre procedure. In cuori disfunzionanti, come in seguito ad operazione cardiocirurgica, la fibrillazione atriale può far peggiorare significativamente la funzione emodinamica. La disfunzione cardiaca stessa può in parte essere causata dalla soluzione iperkaliemica con possibile contributo allo stunning post-arresto cardiaco e alla genesi della sindrome da ridotta gittata cardiaca.

ALM	
Effetti cardiovascolari	Effetti neurologici
Stabilizza potenziale di membrana Riduce resistenze coronariche Antiaritmico Precondizionamento Cardioplegia <ul style="list-style-type: none"> - ↑ gittata cardiaca - ↑ funzione sistolica - ↑ funzione diastolica - ↑ ritorno spontaneo a ritmo sinusale - ↓ troponina e lattati - ↓ necessità di farmaci inotropi - ↓ necessità trasfusioni - ↓ tempi di ospedalizzazione 	Adenosina <ul style="list-style-type: none"> - ↓ flusso Ca^{2+} intracellulare ↓ apoptosi - ↑ aumento K^+ intracellulare - ↓ depolarizzazione Lidocaina <ul style="list-style-type: none"> - ↓ depolarizzazioni - Effetto anti-apoptotico Magnesio <ul style="list-style-type: none"> - Vasodilatante arteriolare - ↓ attivazione NMDA - ↓ flusso Ca^{2+} - ↑ rigenerazione ATP

Tabella VI: Riassunto degli effetti cardiovascolari e neurologici di ALM

Dati gli effetti collaterali della cardioplegia depolarizzante iperkaliemica appare necessario trovare metodiche alternative. Indurre l'arresto tramite depolarizzazione mantenuta risulta poco fisiologico, una nuova strategia dovrebbe rispettare gli equilibri del miocardiocita. Nasce così l'idea di una cardioplegia polarizzante. L'impiego di inibitori dei canali del sodio voltaggio dipendenti per eliminare la fase 0 del potenziale d'azione e aumentare la permeabilità al potassio per iper-polarizzare le cellule e ridurre la lunghezza del potenziale d'azione. A tale scopo si è scelto la lidocaina e l'adenosina che si sono peraltro distinte per le

proprie attività cardioprotettrici. Negli ultimi anni numerosi studi sugli animali hanno evidenziato l'efficacia della combinazione rispetto la cardioplegia tradizionale. Nel 2004 Dobson e Jones riportarono uno studio di cardioplegia in ratto nel quale si confrontava l'efficacia dell'ALM con una soluzione iperkaliemica. Nel gruppo ALM, dopo 4h di arresto, si osservò recupero dell'85-100% della gittata sistolica e di circa l'80% della gittata cardiaca. Per contro solo il 17% del gruppo iperkaliemico sopravvisse. Studio dell'anno successivo su modello canino di by-pass cardiopolmonare ne confermava l'efficacia.¹⁸²

Forti degli entusiastici risultati nella sperimentazione animale si decise infine di impiegare l'ALM in campo medico. Nel 2008 l'ALM fu impiegata in un paziente ad alto rischio: si trattava del quarto intervento cardiocirurgico ed il paziente aveva più di 70 anni. Nonostante quasi 10 ore di intervento, 7 delle quali con aorta clampata, il paziente poté essere svezzato dal CPB senza necessità di contropulsatore ed estubato 12h più tardi.

Il primo esperimento prospettico e randomizzato sull'uomo fu eseguito a Verona. Nel 2012, 80 pazienti coronaropatici con angina instabile, candidati per rivascolarizzazione miocardica vennero selezionati per lo studio. Obiettivo era confrontare la soluzione ALM con la tradizionale cardioplegia iperkaliemica. L'esito fu positivo e si evidenziarono minor rilascio di troponina I, migliore funzionalità cardiaca post-operatoria, minor necessità di defibrillazione per il ripristino del ritmo sinusale, minor necessità di farmaci inotropi positivi e di trasfusione di sangue o emoderivati ed una degenza in terapia intensiva e complessiva ridotta rispetto al gruppo di controllo^{183,184}.

Promettente in ambito cardioplegico, si decise di valutare l'efficacia della soluzione ALM in altri contesti. Nel trapianto di cuore è necessario preservare l'organo espiantato sufficientemente a lungo per il trasferimento. Nel 2011 in uno studio su cuore di ratto si confrontò l'animazione sospesa con ALM due altre soluzioni approvate dalla FDA. Dopo 8 ore a 4°C i cuori in ALM riacquistavano circa 80% della funzione ventricolare contro il 10% dei controlli.¹⁸⁵

La rianimazione ipotesa consiste in un approccio con terapia infusiva meno aggressiva nei soggetti andati incontro a shock emorragico. Anziché infondere volumi sino a raggiungere pressione arteriosa media di circa 65 mmHg si sceglie come obiettivo i 50 mmHg. Nel 2012 Granfeldt valutò l'efficacia dell'ALM nella rianimazione ipotesa in modello sperimentale suino. In tale esperimento evidenziò come un singolo bolo da 20 ml di soluzione 7,5% NaCl+ALM riduceva i volumi necessari a raggiungere la PAM target. Inoltre, si evidenziò come ALM risultasse protettiva sia a livello cardiaco che renale.¹⁸⁶ Altri studi, sempre nell'ambito della rianimazione post emorragico, evidenziavano in aggiunta la capacità

dell'ALM di correggere la funzione coagulativa riducendo il rischio e l'entità della coagulopatia post-trauma.

Efficacie nell'arresto cardiaco controllato, poteva l'ALM proteggere il cuore nell'arresto accidentale? Djabir et al hanno testato il farmaco in modello sperimentale di arresto cardiaco asfittico su ratto: dopo arresto cardiaco, 8 minuti di durata in lieve ipotermia (33-34°C), uno dei gruppi riceveva infusione di ALM. Tale gruppo evidenziò minore mortalità rispetto al gruppo di controllo (0% vs 33%).¹⁸⁷

Gli effetti di ripolarizzazione misurati nei miocardiociti si generano anche a livello neuronale e da questo è nato il concetto di neuroplegia, una soluzione che può bloccare e mantenere a riposo il cervello riducendo la sofferenza ischemica, una soluzione cioè che ha gli stessi effetti della cardioplegia ma sul cervello, permettendo così di “addormentare” il cervello durante fasi di arresto cardiaco o arresto di circolo intra-operatorio con lo scopo di proteggere il cervello dal danno da ischemia-riperfusione.

1.3.3 OSSIDO NITRICO (NO)

La sostanza inizialmente riconosciuta come responsabile del rilassamento vascolare venne chiamata fattore *rilassante endotelio derivato* (EDRF), fu poi dimostrato che questo fattore include ossido nitrico (NO). NO è ormai ben conosciuto come un importante mediatore di molte funzioni fisiologiche, e il suo ruolo nella fisiopatologia cardiaca è ormai riconosciuto. L'NO è una molecola lipofila, estremamente reattiva a causa della presenza di un elettrone spaiato che le conferisce proprietà radicaliche. La lipofilia e l'assenza di carica elettrica gli consentono di diffondere liberamente attraverso le membrane cellulari. L'ossido nitrico è una delle più piccole molecole bioattive dell'organismo umano, essendo composto solamente dall'unione di un singolo atomo di azoto (N) con uno di ossigeno (O).

Alla pressione atmosferica è un gas, e a livello cellulare reagisce con vari composti (ossiemoglobina, ossigeno molecolare, anione superossido, amine, tioli, ecc.) riducendo la sua emivita a pochi secondi (≈ 5 secondi).

SINTESI DELL'OSSIDO NITRICO

L'ossido Nitrico endoteliale modula il tono vascolare e la pressione sanguigna attraverso l'azione della guanosina monofosfato ciclico (cGMP) stimolando il rilassamento del muscolo liscio, l'inibizione della aggregazione piastrinica e la loro adesione all'endotelio, e prevenendo la proliferazione del muscolo liscio (previene ispessimento della parete vascolare). Esistono due categorie di meccanismi fondamentali di produzione di ossido nitrico nell'organismo umano, l'uno *enzima dipendente*, l'altro *enzima indipendente*.

I meccanismi enzima dipendenti comprendono le tre isoforme dell'ossido nitrico sintasi (NOS) e la via della xantina ossidasi in caso di acidosi tissutale.

Il meccanismo indipendente da una via enzimatica riguarda la trasformazione dei nitriti. La NOS trasforma L-arginina in NO e L-citrullina in presenza di NADPH, FMN, FAD, eme e tetraidrobiopterina come cofattori; questa reazione avviene in presenza di ossigeno. (Figura 6)

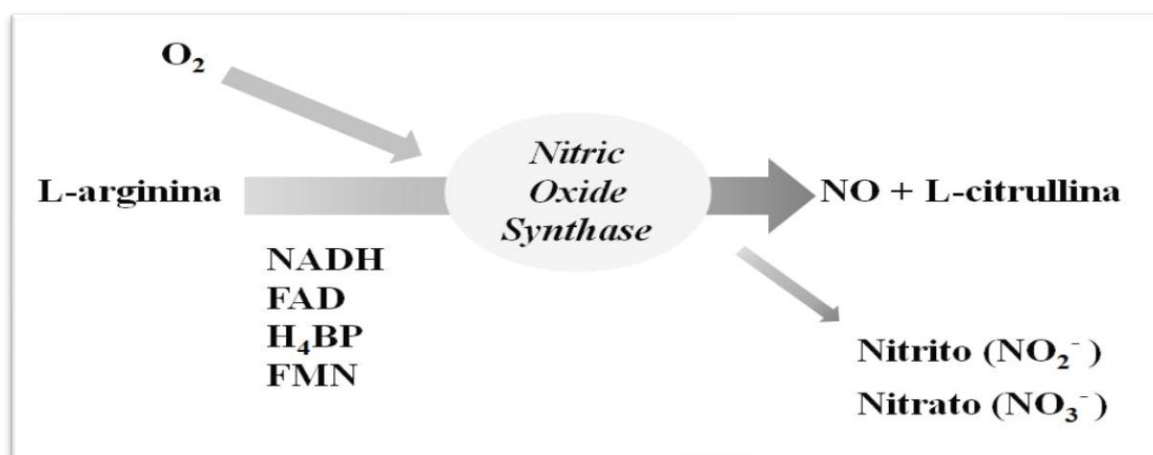


Figura 6: Sintesi in vivo di NO.

La NOS neuronale (nNOS) e la NOS endoteliale (eNOS) vengono prodotte in maniera costitutiva e vengono quindi denominate anche NOS costitutive (cNOS).

La quantità di NO da loro rilasciata è dell'ordine delle nM; la NOS inducibile (iNOS) invece produce quantità μM di NO, cioè una quantità 1000 volte superiore a quella rilasciata dalle cellule in condizioni basali.

Una differenza fondamentale tra le tre isoforme dell'ossido nitrico sintasi è lo stimolo richiesto per la produzione di NO. Mentre per l'attivazione di nNOS ed eNOS sono responsabili due neurotrasmettitori, rispettivamente glutammato e acetilcolina, l'espressione di iNOS viene indotta da citochine proinfiammatorie ($\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$). NF-kB e STAT1 sono due importanti fattori trascrizionali per l'mRNA di iNOS che vengono attivati il primo da $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, il secondo da $\text{INF}\gamma$.

L'NO svolge molteplici funzioni nell'organismo umano e influenza quasi tutti i sistemi biologici. I bersagli molecolari con i quali l'NO interagisce sono infatti numerosi. Produzione di NO è stata anche dimostrata nei cardiomiociti. La produzione durante ischemia miocardica nell'uomo è stata misurata da Node et al.¹⁸⁸ misurando la differenza di concentrazione coronaria artero-venosa di nitrati più nitriti. Nei cardiomiociti ventricolari del ratto adulto sono state dimostrate cNOS e iNOS.¹⁸⁹

DISACCOPIAMENTO DI CNOS

Un endotelio danneggiato produce una grande quantità di anione superossido (O_2^-) rispetto all'endotelio in condizioni normali.

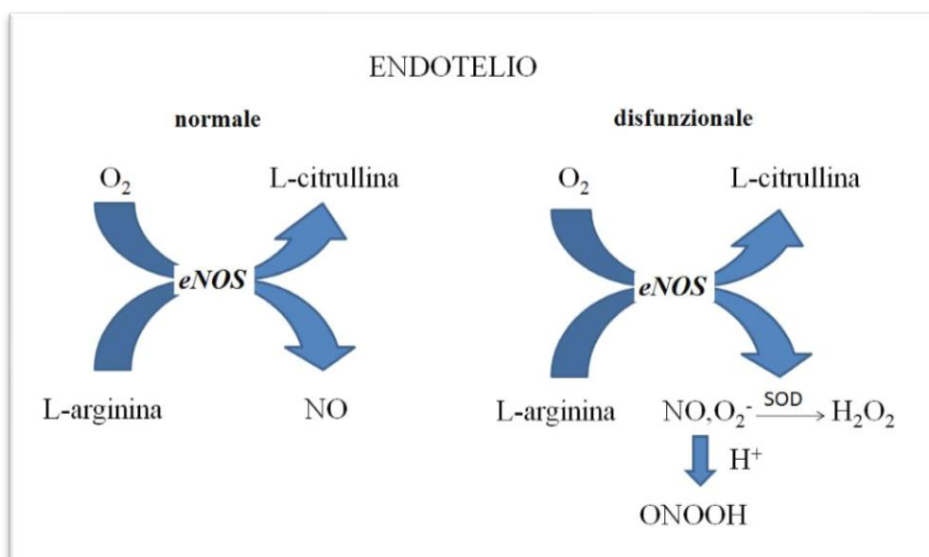


Figura 7: Produzione di NO attraverso eNOS (ossido nitrico sintasi endoteliale) nell'endotelio normale e nell'endotelio disfunzionale.

Basse concentrazioni di L-arginina promuovono il disaccoppiamento di cNOS e la formazione di O_2^- mentre l'aggiunta di L-arginina restaura la produzione di NO e abolisce quella di O_2^- . La contemporanea presenza di NO e O_2^- determina l'innesco di una reazione che porta alla formazione di perossinitrito ($ONOO^-$), un componente altamente citotossico. $ONOO^-$ può essere protonato e formare acido perossinitrico ($ONOOH$) che, a basse concentrazioni, può andare incontro ad una rapida isomerizzazione e formare nitrato (NO_3^-) e un protone (H^+). Tuttavia, ad alte concentrazioni, il gradiente di $ONOOH$ tra la membrana citoplasmatica della cellula endoteliale e il sangue facilita la sua diffusione. Durante il processo di diffusione la molecola di $ONOOH$ viene sottoposta a clivaggio omolitico o eterolitico. Il clivaggio omolitico porta alla formazione di radicale idrossile (OH^\bullet) e radicale diossido di azoto (NO_2^\bullet), entrambi potenti ossidanti. Il clivaggio eterolitico porta alla formazione di un altro potente ossidante: lo ione nitronio (NO_2^+). Questi ossidanti sono la causa maggiore dello stress ossidativo generato dall'endotelio disfunzionale. Lo stress ossidativo riduce la biodisponibilità di NO nel sistema cardiovascolare, causa vasocostrizione dei capillari e aumenta la pressione sanguigna. Inoltre, riduce alcuni cofattori di cNOS favorendone il disaccoppiamento e portando ad ulteriore formazione di radicali. Questi agiscono su numerosi

componenti cellulari portando a inattivazione enzimatica, danno al DNA, perossidazione lipidica e danno di membrana; che possono contribuire alla patogenesi di aterosclerosi, patologie cardiovascolari, neurologiche, polmonari e cancro.

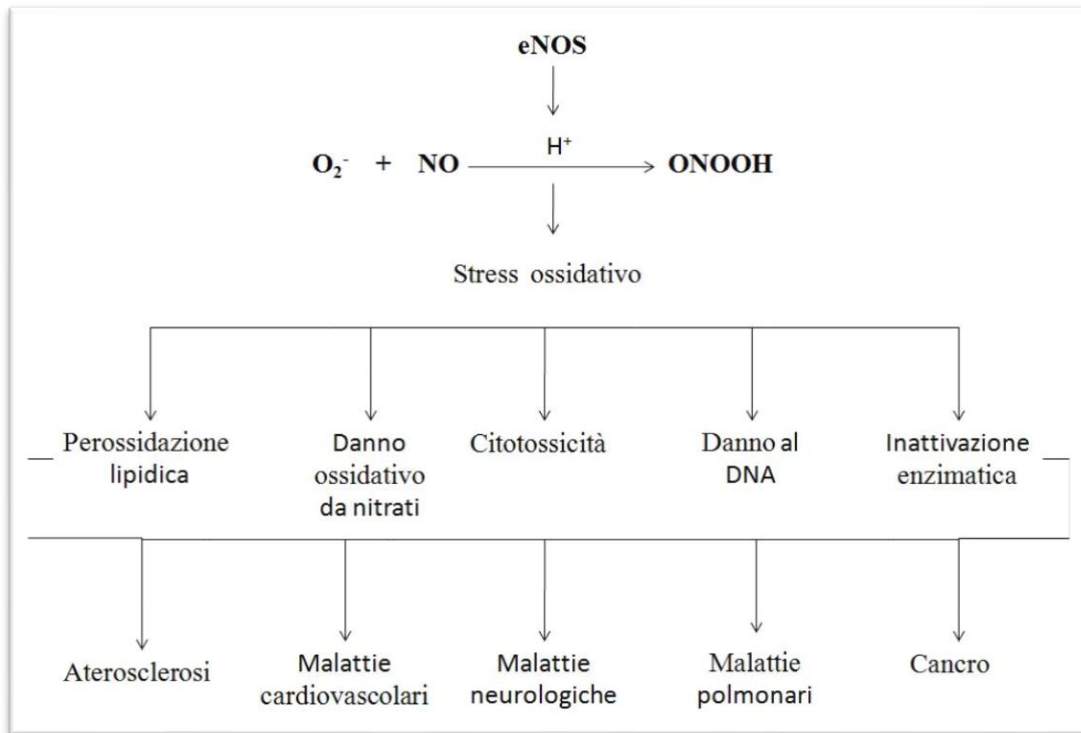


Figura 8: Effetti dei radicali liberi nell'organismo umano. eNOS: ossido nitrico sintasi endoteliale

FISIOLOGIA DEL RILASCIO DI OSSIDO NITRICO DALL'ENDOTELIO

La pressione e la forza di frizione determinata dallo scorrere del sangue sulla superficie endoteliale sono causa di rilascio di NO flusso-indotto. Questa forza che si esprime sull'endotelio è causa di una risposta immediata (in millisecondi o secondi) che si esplica con aumento della permeabilità ionica e dei livelli di calcio intracellulare; e una risposta ritardata (da minuti a ore) attivata dallo stress cronico che include l'espressione di alcuni geni.

La quantità di NO rilasciata dipende direttamente dallo stress di parete e dalla velocità del flusso. Lo stress di parete determina la formazione di un sottile strato di NO al di sotto della membrana cellulare endoteliale dato che cNOS è posta a livello della membrana. Perciò la più alta concentrazione di NO si registra nell'endocardio il quale è esposto ad un flusso altamente turbolento. Una riduzione della presenza di NO determina un aumento dell'adesione

piastrinica e leucocitaria, favorisce l'aggregazione piastrinica e la formazione di coaguli sulla superficie endoteliale.

OSSIDO NITRICO NELL'ATTIVITÀ CARDIACA

Recenti studi hanno dimostrato che agonisti dell'NO endogeni, NO donors esogeni o l'aumento del cGMP favoriscono il rilassamento miocardico inoltre deprimono direttamente la contrattilità cardiaca (effetto inotropo negativo).¹⁹⁰ Con l'aumento del precarico c'è un graduale, non improvviso, ma significativo aumento sia del picco sia del livello basale di NO, mentre a seguito di una riduzione del riempimento ventricolare la concentrazione di NO diminuisce.¹⁹¹ NO è rilasciato dal cuore battente con un andamento pulsatile e la sua sintesi è direttamente correlata alle condizioni di carico ventricolare, contribuendo alla regolazione della performance cardiaca battito a battito.

Sebbene molti tipi di cellule esprimano cNOS, l'azione predominante nella regolazione e nella sintesi del NO carico-dipendente sembra dipendere dall'attività delle cellule endoteliali del microcircolo cardiaco; infatti la maggior parte del NO prodotto dall'endocardio è dissipato velocemente nel flusso sanguigno intracavitario ventricolare dove inibisce l'aggregazione locale delle piastrine. Anche i miociti esprimono cNOS ma non rappresentano una sorgente significativa di NO, almeno in risposta ad una modificazione del carico.

L'importanza dell'NO endoteliale nel regolare il tono vascolare a livello coronarico e sistemico è stato dimostrato sperimentalmente dall'inibizione regionale della sua sintesi con N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) che compete con L-arginina come substrato di NOS.^{192,193}

Il blocco regionale della sintesi di NO riduce significativamente il flusso sanguigno dimostrando l'importanza della sintesi regionale di NO, supportando il ruolo bioattivo dei nitriti dato che il suo consumo aumenta molto con l'esercizio e con l'inibizione della sintesi di NO.¹⁹⁴

Diversi studi hanno dimostrato come l'NO circoli nel plasma anche sottoforma di S-Nitrosotioili (SNOs); l'NO infatti reagisce con i tioili delle proteine, formando composti nitrosilati che possono assumere nuove proprietà fisico-chimiche. I nitrosotioili come l'S-nitrocisteina (SNOC), S-nitroglutazione (GSNO) e S-nitroalbumina (SNOALB), sono capaci di rilasciare l'NO esibendo proprietà simili a quelle del NO stesso; questi vengono suddivisi in SNOs ad alto peso molecolare (HMWSNOs) e a basso peso molecolare (LMWSNOs). SNOALB è sicuramente il più abbondante HMWSNOs, probabilmente la transnitrosilazione

da GSNO e SNOC è il meccanismo principale per la formazione di SNOALB e sembra essere più efficace rispetto al meccanismo di transnitrosilazione a partire da NO libero o farmaci NOdonors.¹⁹⁵

L'abbondanza di S-nitrosotoli nel plasma suggerisce che questi potrebbero costituire un importante reservoir di NO grazie alla loro relativamente lunga emivita in condizioni fisiologiche comparata con la breve emivita di NO libero o dei LMWSNOs¹⁹⁶. Questi S-nitrosotoli a basso ed alto peso molecolare hanno probabilmente un ruolo nella stabilizzazione e nella diffusione di NO nel letto vascolare, dove NO può modificare il tono vascolare.

NO-DONORS

A causa dell'instabilità e della breve emivita di NO c'è un notevole interesse nel ruolo di addotti di NO più stabili per la regolazione del tono vascolare in vivo. A partire da queste considerazioni si è quindi pensato alla possibilità di utilizzare peptidi creati artificialmente per permettere un aumento della presenza di NO in circolo e quindi sfruttarne gli effetti benefici su vascolarizzazione e coagulazione. Molti gruppi di ricercatori hanno sintetizzato NO-donors che dovrebbero potere rilasciare NO selettivamente nel sito bersaglio. Per esempio, V-PYRRO/NO e acido 2-(acetilossi) benzoico 3-(nitrossimetile) fenil estere possono rilasciare NO nel fegato.^{197,198} Tuttavia, questi NO-donors non sono ancora stati applicati in situazioni cliniche perché i meccanismi d'azione non sono ancora del tutto chiari. Quindi nella ricerca di un NO-donor più sicuro si è prospettata la possibilità di utilizzare una proteina trasportatrice di NO cioè una proteina con un'alta efficienza di S-nitrosilazione, un'alta stabilità della forma nitrosilata in circolazione e un'alta efficienza di S-transnitrosilazione all'interno delle cellule bisognose di NO. Come candidato a questo ruolo ha assunto un sempre maggior rilievo l'albumina sierica umana (HSA), perché è la proteina plasmatica più abbondante e perché gli S-nitrosotoli endogeni nel plasma umano sono ampiamente associati con HSA. Inoltre, HSA S-nitrosilata (S-NO-HSA), come quella sviluppata da Seth Hallström¹⁹⁹ è molto più stabile dei S-nitrosotoli a basso peso molecolare.

Ristabilire il flusso sanguigno in tessuti ischemici è una tappa di molte procedure chirurgiche. Specialmente dopo ischemia prolungata la riperfusione può portare a cambiamenti nella motilità vasale e portare ad un aumento della concentrazione di molte specie reattive e un aumento della permeabilità portando ad edema.

In uno studio che prevedeva il trattamento con S-NO-HSA in un coniglio a cui era stata indotta una ischemia della zampa posteriore della durata di 2 ore seguita da riperfusione sono stati ricavati dei dati che rilevano che S-NO-HSA preserva la funzione di eNOS, previene il suo disaccoppiamento, stabilizza la produzione basale di NO, diminuisce la produzione di specie ossidate e perciò ha effetti benefici nel ridurre il danno da ischemia/riperfusione. Risulta evidente una deficienza di NO alla fine dell'ischemia e all'inizio della riperfusione indicando l'efficacia e la necessità dell'impiego di un farmaco NO-donor. Viene inoltre evidenziato che il pretrattamento prima dell'induzione dell'ischemia risulta essere più efficace nel ridurre il danno. Anche la misurazione dei fosfati ad alta energia dimostra una maggior preservazione della funzione mitocondriale quando viene impiegato il farmaco.

In un secondo studio è stato ricreato un modello che simulava l'espianto e la conservazione fredda degli organi in un cuore isolato di coniglio che veniva sottoposto ad un'ischemia di 6 ore.²⁰⁰ Semsroth et al. dimostra così come con l'utilizzo di S-NO-HSA la gittata cardiaca, la funzione diastolica, la perfusione miocardica siano sostanzialmente aumentati rispetto a ciò che succede in condizioni di assenza del farmaco. Questi dati possono suggerire la possibilità concreta dell'utilizzo di farmaci NO-donors nella preservazione cardiaca in ischemia fredda durante by-pass cardio-polmonare e nella preservazione degli organi da trapiantare.

In un ulteriore esperimento Dworschak et al. ha ricreato un'ischemia miocardica severa con by-pass cardio-polmonare in cuore di maiale.²⁰¹ Si è così evidenziato, negli animali trattati con S-NO-HSA, un aumento dell'estrazione di ossigeno a livello tissutale miocardico, presumibilmente perché il numero di capillari perfusi rimane più elevato e si formano meno shunt. Dopo ischemia miocardica severa l'aumentato flusso coronarico e il più alto consumo di O₂ sono stati associati ad una migliore funzione cardiaca. Infatti, la pressione sistolica del ventricolo sinistro (LVSP) e la pressione arteriosa media (MAP) erano notevolmente più alte negli animali trattati dopo lo svezzamento dal by-pass cardio-polmonare.

Anche in uno studio di ischemia calda, non protetta, di cuore di maiale²⁰² si è notato che l'infusione di S-NO-HSA preserva la funzione di eNOS stabilizza produzione di NO, diminuisce produzione di O₂⁻ e ONOO⁻ e ha effetti benefici sull'emodinamica dipendente dalla riduzione del danno da ischemia/riperfusione. Dopo svezzamento dal by-pass cardio-polmonare MAP diminuisce in entrambi i gruppi (trattati e non trattati), tuttavia la diminuzione nel gruppo con S-NO-HSA era significativamente meno pronunciata dopo 15 minuti e dopo 75 minuti dallo svezzamento. Inoltre, nel gruppo trattato MAP si stabilizza dopo 120 min mentre nel gruppo non trattato continua a diminuire. Per di più MAP nel gruppo trattato era significativamente più bassa.

LVSP aumenta in entrambi i gruppi, tuttavia solo in quelli trattati rimane ad alti livelli, mentre torna a livelli basali nei controlli.

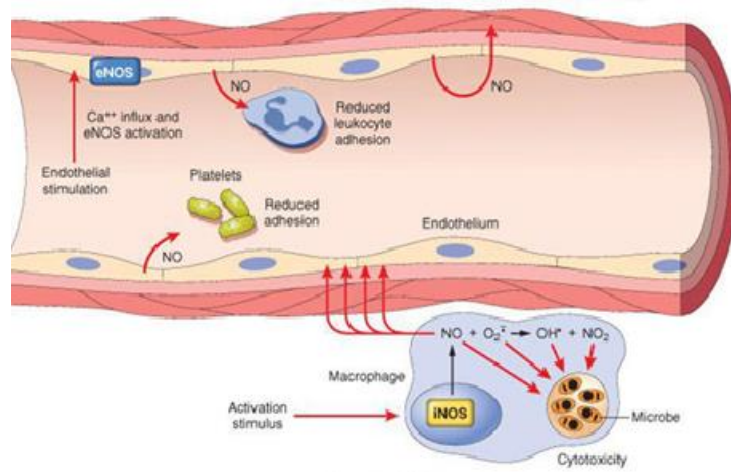


Figura 9: Metabolismo dell'ossido nitrico. eNOS: ossido nitrico sintasi endoteliale; iNOS: ossido nitrico sintasi inducibile.

APPLICAZIONI CLINICHE DELL'OSSIDO NITRICO

Uso dell'ossido nitrico per via inalatoria nei neonati e nei bambini. L'uso dell'iNO nel neonato a termine o quasi a termine è oramai consolidato nella pratica clinica, ed è stato approvato nel 1999 dalla Food and Drug Administration. Questo tipo di trattamento è indicato in neonati di età gestazionale maggiore di 34 settimane affetti da insufficienza respiratoria ipossiémica non responsivi ai trattamenti standard.

L'insufficienza respiratoria ipossiémica acuta può esser causata da varie patologie, come infezioni, sindrome da aspirazione di meconio, sindrome da distress respiratorio (RDS), persistenza della circolazione fetale.^{203,204,205} Le patologie che ricevono più benefici da questo tipo di trattamento sono quelle associate ad ipertensione polmonare e shunt extrapolmonare destro sinistro, mentre in altre forme, come quelle caratterizzate da alterazioni del parenchima o con shunt prevalentemente di tipo intrapolmonare (sepsi, polmonite, RDS) vanno associati al trattamento con iNO altre terapie volte a risolvere la patologia sottostante.^{206,207} Importante è escludere tramite ecocardiografia cardiopatie congenite cianotizzanti che possono dare ipertensione polmonare ma non rispondono alla terapia con iNO: addirittura la terapia con iNO è risultata dannosa in questi pazienti, in quanto la vasodilatazione polmonare data dal

farmaco potrebbe aumentare il precarico sinistro.²⁰⁸ Per lo stesso motivo è importante rilevare tramite ecocardiografia una situazione di insufficienza ventricolare sinistra.

Altre controindicazioni alla terapia con iNO nel neonato sono: malformazioni gravi, anomalie cromosomiche letali e grave discoagulopatia.²⁰³ Dal momento che la risposta alla terapia con iNO migliora ottimizzando il reclutamento alveolare²⁰⁹, è consigliabile trattare questi pazienti con surfactante esogeno e supporto ventilatorio prima di iniziare la terapia.²¹⁰

Da diversi studi condotti su neonati a termine o quasi a termine è risultato un miglioramento dell'ossigenazione e una ridotta necessità di ricorso all'ECMO.^{211,212}

L'impiego di iNO nel neonato prematuro con età gestazionale <34 settimane è invece sconsigliato.

I dosaggi considerati efficaci nel trattamento dei neonati sono di 20 ppm come concentrazione iniziale. In alcuni casi, come ad esempio se vi è ipertensione polmonare grave con scarsa risposta, si può considerare una dose tra 30-40 ppm. Dosaggi in concentrazioni superiori non aumentano l'efficacia e determinano anzi un maggior rischio di tossicità, aumentando i livelli metaemoglobina. Il parametro con cui si valuta la risposta alla terapia è il miglioramento rapido dell'ossigenazione: la mancanza di un miglioramento del 20-25% nelle prime 4-6 ore indica la mancata risposta al trattamento. Nel caso il paziente non risponda alla terapia si devono considerare terapie alternative come per esempio l'ECMO. La durata media di un trattamento varia da 3 a 7 giorni, in seguito si attua una riduzione graduale e progressiva delle dosi fino a concentrazioni finali che dovrebbero essere idealmente di 1 ppm o inferiori. È importante in alcuni casi aumentare preventivamente la FiO₂, per prevenire possibili effetti rebound caratterizzati da crisi di desaturazione e ipertensione polmonare. Per quanto riguarda gli outcome a lungo termine, come ad esempio il grado di deficit neurologico e la frequenza di riospedalizzazione, non sono state dimostrate differenze significative rispetto ai gruppi di controllo.

Recentemente il gas medicale ossido nitrico è stato utilizzato in sala operatoria di cardiocirurgia in maniera poco convenzionale da P. Checchia nel 2013²¹³ e da C. James nel 2016.²¹⁴ In uno studio del 2013 P.Checchia et al. hanno infatti collegato l'erogatore dell'NO direttamente all'ossigenatore del CPB in 8 bambini sottoposti ad intervento di tetralogia di Fallot rilevando riduzione del tempo di ventilazione meccanica, di permanenza in terapia intensiva e una miglior performance cardiaca. Nel 2016 invece presso l'ospedale di Melbourne ben 101 bambini sottoposti a diverse procedure di riparazione di cardiopatie congenite hanno ricevuto NO 20 ppm direttamente attraverso l'ossigenatore del CPB durante l'intervento. James e gli altri autori rilevano in questi pazienti un miglioramento del cardiac

output e una riduzione della sindrome da bassa gittata cardiaca. Questi studi sono stati fonte di ispirazione per uno dei nostri modelli sperimentali.

EFFETTI DELL'OSSIDO NITRICO NELLA SINDROME POST ARRESTO CARDIACO

L'ossido nitrico presenta varie caratteristiche fisiologiche che possono dare un beneficio nel danno da ischemia-riperfusion: è un potente vasodilatatore che inibisce attivazione e l'adesione di piastrine e leucociti, presenta la capacità di inibire gli enzimi responsabili della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e funge direttamente da scavenger per i ROS. Questi effetti sembrano essere mediati da vari meccanismi ma quello prevalente risulta essere l'attivazione di pathways molecolari tramite l'aumento della quantità di cGMP prodotto dalla guanilato ciclasi.

I benefici dell'ossido nitrico per via inalatoria su organi extrapolmonari sono stati dimostrati da vari esperimenti su modelli animali; dapprima su topi da Hataishi et al., dove la somministrazione di iNO per 24 ore post riperfusion ha limitato il danno a livello cardiaco e migliorato le funzioni sistolica e diastolica,²¹⁵ in seguito su modello porcino, dove sono stati riconfermati gli stessi risultati.²¹⁶ Studi sugli effetti dell'iNO in organi extrapolmonari sono stati condotti con buoni risultati anche su esseri umani, nell'ambito del trapianto epatico²¹⁷ e nel contesto di bypass cardiopolmonare, dove l'inalazione di 20 ppm di iNO durante e dopo il CPB ha dimostrato un decremento del danno miocardico e un miglioramento della disfunzione ventricolare sinistra.²¹⁸

Lo studio condotto da Kida e Ichinose²¹⁹ dimostra inoltre che la somministrazione di iNO in topi post arresto cardiaco e successiva rianimazione cardiopolmonare ha dimostrato una diminuzione dello sviluppo di anomalie di diffusione dell'acqua a livello cerebrale e di conseguenza un miglioramento degli outcome neurologici e del tasso di sopravvivenza. È stato osservato inoltre nei topi trattati con iNO una diminuzione dell'espressione di geni codificanti proteine pro-infiammatorie come citochine e la NADPH ossidasi, suggerendo che questa possa avere un ruolo fondamentale nello sviluppo di disfunzioni neurologiche.

Una review del 2013 riporta tutti i meccanismi coinvolti nel danno da ischemia e riperfusion nel cervello e come questi meccanismi siano influenzati dalla somministrazione di ossido nitrico o di molecole NO-donors. L'ossido nitrico riduce l'attivazione dell'NF-KB, riduce la risposta infiammatoria, riduce attivazione delle Caspasi e quindi l'apoptosi portando infine ad una riduzione dell'area ischemica e ad un miglioramento del flusso ematico cerebrale.²²⁰

1.4 EXTRACORPOREAL MEMBRANE OXIGENATION (ECMO)

DEFINIZIONE E CENNI STORICI

L'ECMO (extracorporeal membrane oxigenation) è un supporto di tipo circolatorio, utilizzato per supportare la funzione respiratoria ed eventualmente anche la funzione cardiaca. Si basa sui principi del bypass cardiovascolare utilizzato in ambito cardiocirurgico, con la differenza che l'ECMO è un circuito chiuso (è assente il reservoir esterno per il sangue) ed è studiato per essere utilizzato sul paziente per un periodo prolungato e non solo per poche ore.

L'indicazione principale per l'ECMO è lo shock cardiogeno con disfunzione d'organo, oppure una disfunzione cardiaca rapidamente reversibile (miocardite, overdose, ipotermia profonda).²²¹ È da considerarsi una terapia “ponte”: il paziente viene trattato in attesa che recuperi le funzioni vitali oppure che si adotti una strategia terapeutica efficace.

Il primo intervento nel quale venne utilizzata una macchina cuore-polmone sull'uomo fu eseguito da Gibbon nel 1953, nel 1972 venne utilizzato per la prima volta l'ECMO al di fuori della sala operatoria²²² con risultati incoraggianti su bambini e neonati affetti da insufficienza respiratoria. Ad oggi l'ECMO viene utilizzato nella pratica clinica della terapia intensiva come supporto cardiorespiratorio nei pazienti pediatrici. Per quanto riguarda i pazienti adulti, i primi studi non furono affatto incoraggianti, ma recentemente con il miglioramento dei componenti (come l'implementazione della pompa centrifuga e del nuovo ossigenatore) nuovi studi suggeriscono ottimi risultati anche su questo tipo di pazienti.

COMPONENTI

Il circuito dell'ECMO è costituito da una pompa, un ossigenatore, uno scambiatore di calore, cannule arteriose e venose ed un set di tubi per connettere il paziente alla macchina.

Le cannule possono essere di diverso diametro e lunghezza, presentano una punta sagomata per facilitare la penetrazione del vaso arterioso, bobine metalliche di rinforzo e una porzione prossimale rigida che va connessa alle tubature. Le cannule venose sono usualmente più spesse e lunghe di quelle arteriose.

La pompa è di tipo centrifugo, lavora creando un differenziale di pressione che permette al sangue di fluire. Un sensore calcola il flusso in L/min. Questo tipo di pompa ha il vantaggio di dare meno emolisi di altre tipologie e si stoppa in caso di presenza di aria nel circuito. Questo tipo di pompa è non occlusiva, perciò vi può essere un flusso di ritorno del sangue, specialmente se l'ECMO lavora con basse pressioni e la pressione generata dal cuore del

paziente è maggiore. È importante tenere sempre monitorato questo flusso retrogrado ed essere pronti a clampare il tubo arterioso nel caso la pompa smetta di funzionare. Il circuito è composto da tubi di PVC sterili trattati con anticoagulanti per ridurre il rischio di trombi.

Il sangue passa attraverso un ossigenatore, che permette lo scambio dei gas. È composto da fibre multiple dal diametro $<0,5\text{mm}$, ricoperte di un polimero idrofobico (polimetilpentene) che permette il passaggio del gas tramite gradiente di pressione ma non di liquido. La capacità della membrana è dieci volte più bassa di quella di un polmone sano (3000 vs. 200-250 mL/min).

Lo scambiatore di calore viene utilizzato per riscaldare, tramite convezione, il sangue del paziente; l'acqua calda circola attorno all'ossigenatore e riscalda indirettamente il sangue.

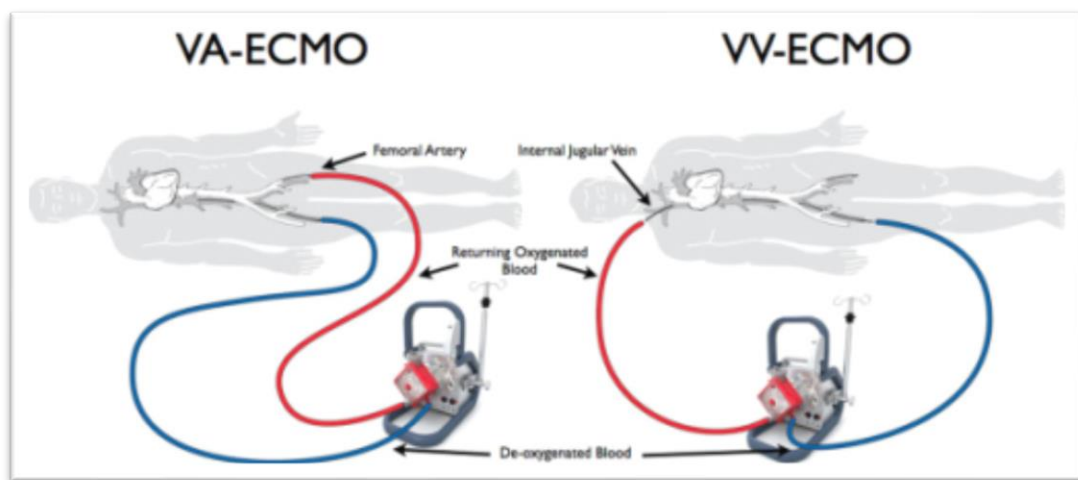


Figura 10: Rappresentazione schematica delle due modalità, venovenoso (VV-ECMO) e venoarterioso (VA-ECMO), di impiego dell'ECMO.

TECNICHE

Il principio dell'ECMO consiste nel raccogliere il sangue venoso del paziente e di passarlo attraverso una pompa ed un ossigenatore in modo da reimmettere nel paziente sangue ossigenato. Il sangue venoso viene tipicamente drenato da una vena di grosso calibro come per esempio la vena femorale, viene ossigenato, decarbossilato attraverso una membrana ed infine reintroito nella circolazione tramite accesso venoso o arterioso, a seconda del tipo ECMO. Esistono infatti due tipologie di ECMO: l'ECMO venoarterioso (ECMO-VA), utilizzato per supportare totalmente la funzione cardiopolmonare e l'ECMO venovenoso (ECMO-VV), che invece supporta solamente la funzione respiratoria ossigenando il sangue.

ECMO-VA

Le indicazioni più frequenti per l'uso dell'ECMO-VA sono rappresentate da tutte le cause di shock cardiogeno refrattario ai trattamenti medici: infarto miocardico, miocardite, arresto cardiaco refrattario, shock cardiogeno post CPB, rigetto trapianto, tossicità da farmaci, ipotermia accidentale, embolia polmonare, scompenso cardiaco acuto e cronico.

In questi casi l'insufficienza di pompa cardiaca porta rapidamente ad ipossia tissutale dovuta all'incapacità di mantenere un flusso adeguato e quindi di conseguenza a deficit multiorgano.

La tecnica più utilizzata per inserire questo tipo di dispositivo è l'approccio chirurgico femoro-femorale: si accede ai vasi femorali a livello del triangolo di scarpa e dopo aver localizzato la arteria e la vena femorale si cateterizzano i due vasi tramite la tecnica di Seldinger. Il paziente viene scoagulato con un bolo di eparina non frazionata; la cannula venosa viene posizionata prima in vena cava e poi in atrio destro sotto controllo ecocardiografico, poi si prosegue con l'inserimento della cannula arteriosa. In seguito, un catetere di riperfusione viene posizionato al di sotto del catetere arterioso, per assicurare la perfusione a livello degli arti inferiori. È possibile anche un approccio percutaneo tramite controllo ecografico che richiede comunque una rimozione chirurgica.

È possibile inoltre cannulare direttamente l'atrio destro e l'aorta discendente (ECMO VA-C): questo avviene frequentemente nei casi di shock cardiogeno post CPB in quanto lo sterno risulta già aperto e di conseguenza ne facilita l'installazione.

ECMO-VV

Questo tipo di supporto viene solitamente usato in pazienti con una funzione cardiaca normale, tendenzialmente si tratta di pazienti con una ARDS (acute respiratory distress syndrome) severa, non responsiva alle terapie convenzionali. Questa tipologia di ECMO assicura lo scambio dei gas e il mantenimento della ventilazione meccanica a bassi volumi (gentle ventilation) in modo da mettere il polmone "a riposo" e permetterne la guarigione.

I siti di cannulazione sono prevalentemente femoro-giugulari: la cannula di efflusso viene inserita nella vena femorale mentre la cannula di influsso viene inserita a livello della vena giugulare interna. Tendenzialmente per incannulare si utilizza una tecnica percutanea.

UTILIZZO DELL'ECMO NELL'ARRESTO CARDIACO

*Nella paziente pediatrico e neonatale*²²³ L'utilizzo dell'ECLS è indicato prevalentemente nell'arresto cardiaco refrattario, con possibilità di ragionevoli opzioni terapeutiche: le principali strategie per cui viene utilizzato sono principalmente:

1. come ponte per il recupero (nelle patologie reversibili)
2. come ponte per un'altra terapia (come la VAD o l'ossigenatore)
3. come ponte per il trapianto di organo
4. come ponte per la decisione terapeutica (permette il recupero e la stabilizzazione temporanea del paziente).

Le indicazioni per l'ECLS, secondo le linee guida ELSO, nel paziente pediatrico sono suddivise in due categorie:

- correlate alla chirurgia cardiaca ed alla cateterizzazione; per fallimento dello svezzamento dal bypass cardiopolmonare, come supporto in elezione durante procedure di cateterizzazione ad alto rischio, per bassa gittata cardiaca post-operatoria, per stabilizzare un paziente instabile prima di un'operazione;
- arresto cardiaco, dovuto a varie cause:
 - cardiogenico, dovuto a miocardite, cardiomiopatia, aritmie intrattabili
 - distributivo (sepsi, anafilassi)
 - ostruttivo (embolia polmonare, ipertensione polmonare)
- arresto cardiaco intraospedaliero non responsivo alla rianimazione cardiopolmonare, se lo specialista ECMO è facilmente reperibile.

Per quanto riguarda le controindicazioni ve ne sono di assolute e di relative, in particolare vi sono la prematurità ed il basso peso alla nascita, anomalie cromosomiche letali (trisomia 18, trisomia 13), emorragia incontrollabile e danno cerebrale irreversibile.

*Nel paziente adulto*²²⁴ l'indicazione principale è lo shock cardiogeno refrattario alla terapia con inotropi e vasocostrittori ed eventualmente all'utilizzo del contropulsatore intraaortico. Le cause tipiche che portano a questa condizione sono miocarditi, infarto acuto del miocardio, cardiomiopatia peripartum, scompenso cardiaco cronico non responsivo, shock post cardiectomia.

L'utilizzo di ECMO nell'arresto cardiaco è indicato quando:

- l'arresto è testimoniato ed iniziato da meno di 3-5 minuti prima di applicare manovre rianimatorie

-il tempo intercorso tra inizio della CPR e manovre ALS e il tempo di impianto dell'ECMO è minore di 100 minuti

-pazienti con età minore ai 65 anni,

-il ritmo causante l'arresto cardiaco non è l'asistolia

- in caso di ipotermia accidentale.

Le controindicazioni assolute sono rappresentate da pazienti con cuore irrecuperabile e non candidato a trapianto o VAD, età avanzata, disfunzioni d'organo croniche come enfisema, cirrosi ed insufficienza renale, compliance del paziente, RCP prolungata senza una perfusione tissutale adeguata.

Nonostante gli avanzamenti nelle tecniche, nei protocolli ECLS e nelle strumentazioni la mortalità dell'arresto cardiaco rimane sempre alta. L'incidenza di arresto cardiaco in europa è di 2.500/100.000 abitanti all'anno di questi pazienti solo il 40% arriva in ospedale dopo un'adeguata CPR e ROSC. Di questi pazienti solo un terzo sopravvivono 30 giorni dopo l'evento e vengono dimessi dall'ospedale. Quindi solo il 12% dei pazienti che hanno subito un arresto cardiaco sono vivi dopo 30 giorni. Il numero di pazienti sopravvissuti può aumentare con l'utilizzo dell'ECMO. Secondo i dati ricavati dal registro ELSO nel periodo tra il 2003 e il 2014 la sopravvivenza a 30 giorni in pazienti sottoposti ad ECLS dopo arresto cardiaco risulta essere del 29%. Nonostante l'avanzamento delle conoscenze e delle tecniche di ECLS la mortalità dell'arresto cardiaco continua ad essere influenzata dall'aumento delle comorbidità dei pazienti, in particolare negli anziani e dall'insorgenza di danni neurologici irreversibili.²²⁵

2. SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio condotto negli ultimi 3 anni e negli anni precedenti è stato trovare metodi alternativi per migliorare cardioprotezione e neuroprotezione in presenza di un danno da ischemia e riperfusione causato da un arresto della circolazione sanguigna spontanea. Durante questo tempo sono stati testati diversi composti quali WIN 55-212, DADLE, ALM, iNO le cui proprietà sono già state discusse. Oltre a farmaci dalle proprietà neuro protettive è stato nodo fondamentale della ricerca svolta sulla neuroprotezione l'impiego dell'ipotermia e lo studio dei metodi di riscaldamento dopo ipotermia accidentale.

Durante gli anni di dottorato il modello sperimentale iniziale è evoluto e migliorato e alcune modifiche sono state fatte nelle tecniche chirurgiche e nel circuito del CPB, gli esperimenti saranno così divisi identificando 3 modelli sperimentali principali:

- Modello di arresto cardiaco ed ECLS
- Modello di arresto di Circolo e SCP tramite CPB
- Modello di arresto cardiaco da ipotermia accidentale e riscaldamento tramite ECLS

I modelli verranno descritti in dettaglio nella sezione materiali e metodi, verranno poi discussi i protocolli utilizzati con i diversi modelli sperimentali.

In seguito, verranno esposti i protocolli dei vari studi, ed uno ad uno esposti risultati, discussione e conclusione. In tutti gli studi abbiamo sempre analizzato funzionalità cardiaca e sono stati analizzati campioni tissutali di miocardio oltre che di cervello. Tema della tesi è lo studio e la ricerca di metodi di neuroprotezione dopo danno da ischemia e riperfusione per cui verranno mostrati e discussi i soli risultati inerenti ai reperti cerebrali e neurologici.

3. MATERIALI E METODI

Tutti gli studi sperimentali si sono svolti presso il C.I.R.S.A.L. (Centro Interdipartimentale di Ricerca su Animali da Laboratorio) degli Istituti Biologici, Università degli Studi di Verona.

La stabulazione, la manipolazione e il sacrificio degli animali sono stati eseguiti secondo le normative vigenti (Dichiarazione di Helsinki e “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – Institute of Laboratory Animal Resources – National Institutes of Health”).

Sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague Dawley del peso di 400 ± 50 grammi mantenuti in stanze a temperatura ed umidità controllata con tipico ciclo luce-buio nutriti con mangime standard ed acqua ad libitum.

Per tutti gli esperimenti, indipendentemente dal modello di arresto cardiaco utilizzato, la fase di anestesia, intubazione, preparazione e monitoraggio è stata sempre la medesima.

Dopo una pre-anestesia dell'animale con vapori di etere dietilico, i ratti sono stati intubati per via oro-tracheale con un tubicino atraumatico costituito da una cannula venosa di 14 G. I ratti sono stati quindi ventilati meccanicamente con un respiratore meccanico per roditori (Harvard Model 687, Harvard Apparatus, Holliston MA) con una miscela di ossigeno e anestetico sevoflorano al 2% (Forene; Abbott, Baar, Switzerland) che ne ha permesso l'anestesia per tutta la durata dell'intervento con una frazione di ossigeno inspirato (FiO_2) del 90%, un tidal volume di 10 ml/kg e una frequenza di 80 atti respiratori al minuto, per mantenere l'analgesia è stato iniettato sottocute Ketoprofene 2mg/kg e ripetuto ogni 2 ore.

Durante la procedura chirurgica, la temperatura della stanza è stata mantenuta tra i 23° e i 25°C ed è stato posto uno strato di materiale isolante (sughero) tra il corpo dell'animale e il tavolo operatorio.

Posizionato l'animale in posizione supina, la superficie toracica, la superficie ventrale del collo e delle zampe posteriori sono state rasate e la cute è stata disinfettata con clorexidina.

Durante l'intero svolgimento degli esperimenti viene mantenuto monitoraggio dell'ECG e della temperatura corporea tramite sonda rettale. L'arteria femorale destra viene isolata e si inserisce un catetere miniaturizzato del diametro di 2-Fr (modello SPR 838, Millar Instruments, Houston, TX) per il monitoraggio della pressione arteriosa sistemica. Infine, viene cannulata la vena femorale destra con agocannula da 24 G per l'infusione di 2 mg/kg di pancuronium-bromuro per ottenere il completo rilassamento muscolare e lavata con soluzione fisiologica per evitare trombosi della cannula.

3.1 I 3 MODELLI DI ARRESTO CARDIACO

MODELLO DI ARRESTO CARDIACO ED ECLS

L'accesso al cuore viene ottenuto attraverso una sternotomia mediana seguita dall'apertura del torace con un divaricatore. Al fine di velocizzare e semplificare i procedimenti dopo l'arresto cardiocircolatorio si provvede in anticipo alla preparazione degli animali per l'assistenza extracorporea con cannulazione periferica. Dopo aver inciso la cute e i piani sottocutanei sulla linea mediana del collo viene identificata la trachea e subito a destra di questa il fascio vascolo-nervoso. Una cannula venosa (una versione modificata a 4 fori di catetere di calibro di 5 French) viene avanzata attraverso la vena giugulare esterna destra fino all'atrio destro permettendo un ottimo drenaggio venoso. L'arteria carotide comune sinistra viene incannulata con un catetere 24 G che è fatto avanzare fino all'arco aortico e collegato alla linea di perfusione arteriosa del circuito.

Dopo l'apertura del pericardio si provvede all'induzione dell'arresto cardio-circolatorio ottenuto mediante Fibrillazione Ventricolare utilizzando un fibrillatore erogante una corrente di 3.5 mA a 60 Hz rilasciata a livello del ventricolo destro in regione epicardica. Il flusso di corrente viene mantenuto per 3 minuti per prevenire una depolarizzazione spontanea e l'arresto cardiaco è poi mantenuto per 10 minuti. Un'eparinizzazione completa (eparina 500 UI/kg) viene eseguita immediatamente prima dell'inizio della circolazione extracorporea.

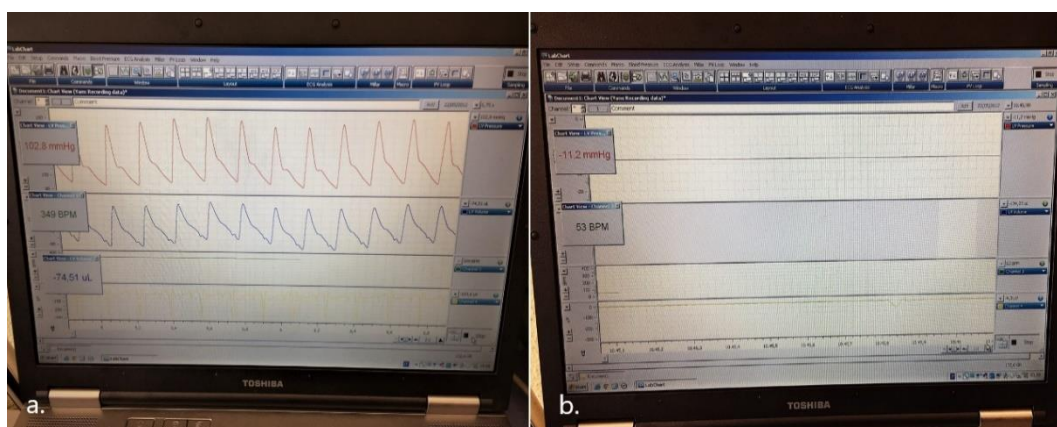


Figura 11: a. Tracciato ECG e curva di pressione pre-arresto. b. Tracciato ECG e curva di pressione durante l'arresto.

Il circuito di circolazione extracorporea è costituito da una pompa a rulli, un ossigenatore a fibre cave con caratteristiche industriali standard (Sorin, Mirandola, MO, Italia), un vuoto

regolatore con una pressione di -30/-40 cmH₂O per facilitare il drenaggio venoso, il tutto collegato da tubo di plastica di 1,6 millimetri di diametro interno. Il volume totale di riempimento del circuito extracorporeo compreso l'ossigenatore, è di 6 ml e costituito da soluzione colloide (50%) e Ringer Lattato (50%), la superficie di scambio del gas è di 450 cm² e la superficie di scambio termico di 15,8 cm².

La circolazione extracorporea viene mantenuta con una portata di 80-100 ml/kg/min e un range di pressione arteriosa media di 70-90 mmHg. La ventilazione meccanica viene interrotta all'induzione della FV e durante la circolazione extracorporea.

Durante l'esperimento vengono effettuati anche degli emogas arteriosi per poter gestire al meglio il CPB e la ventilazione meccanica.

Dopo 1 ora di riperfusione tramite ECLS il ratto viene svezzato dal CPB, vengono effettuate le misurazioni emodinamiche inserendo il catetere di Millar dalla carotide destra fino al ventricolo sinistro e immediatamente dopo il ratto viene sacrificato prelevando cuore, polmoni e cervello.

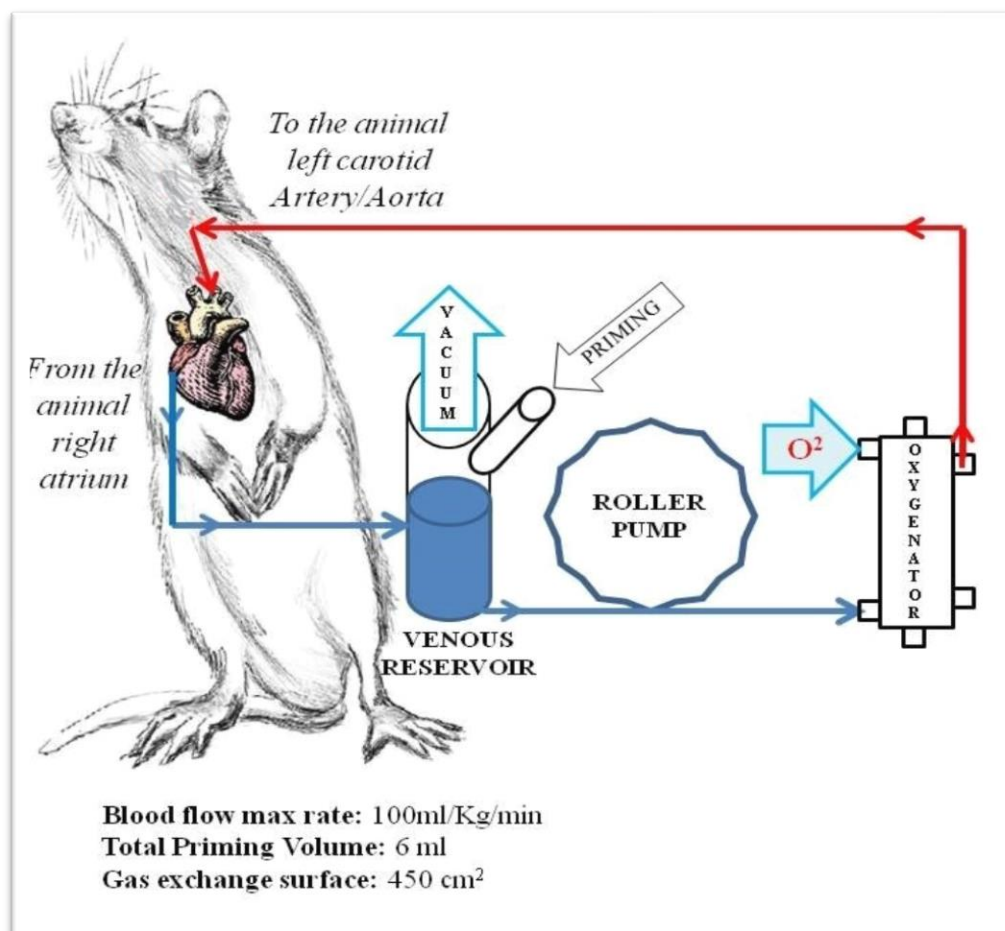


Figura 12: Modello di circolazione extracorporea. Cannula venosa 5 Fr inserita in vena giugulare destra ed avanzata in atrio destro e cannula arteriosa 24 G in carotide comune sinistra.

MODELLO DI ARRESTO DI CIRCOLO ED SCP TRAMITE CPB

L'accesso al cuore si è ottenuto attraverso una sternotomia mediana seguita dall'apertura del torace con un divaricatore. Dopo aver inciso la cute e i piani sottocutanei sulla linea mediana del collo veniva identificata la trachea e subito a destra di questa il fascio vascolo-nervoso. Una cannula venosa (una versione modificata a 4 fori di catetere di calibro di 5 French) è stata avanzata attraverso la vena giugulare esterna destra fino all' atrio destro permettendo un ottimo drenaggio venoso. L'arteria carotide comune sinistra è stata incannulata con un catetere 24 G che è stato fatto avanzare fino all'arco aortico e collegato alla linea di perfusione arteriosa del circuito. Inoltre, per poter effettuare la perfusione cerebrale durante l'arresto di circolo nella stessa carotide è stato posizionato catetere 26 G rivolto in direzione opposta al catetere di 24 G cioè verso la testa del ratto.

Il circuito di circolazione extracorporea è costituito da una pompa roller (Stöckert SIII, Sorin, Germania), un ossigenatore a fibre cave con caratteristiche industriali standard (Sorin, Mirandola, MO, Italia), un vuoto regolatore con una pressione di -30 mmHg per facilitare il drenaggio venoso, il tutto collegato da tubo di plastica di 1,6 millimetri di diametro interno. Il volume totale di riempimento del circuito extracorporeo compreso l'ossigenatore, è stato di 6 ml e costituito da soluzione colloidale e Ringer lattato, la superficie di scambio del gas era di 450 cm² e la superficie di scambio termico di 15,8 cm². Una volta preparati gli accessi venosi e arteriosi il ratto è stato collegato al circuito del CPB e mantenuto con una portata di 80-100ml/kg/min e un range di pressione arteriosa media di 70-90 mmHg.

Dopo essersi assicurati dell'adeguato drenaggio venoso e dell'adeguata stabilità emodinamica la ventilazione meccanica è stata sospesa e si è proceduto a clampaggio dell'aorta ascendente con un clamp micro vascolare, il drenaggio venoso e il CPB sono stati sospesi ed è stato indotto un arresto cardiocircolatorio, il cuore è stato fermato mediante Fibrillazione Ventricolare utilizzando un fibrillatore erogante una corrente di 3.5 mA a 60 Hz rilasciata a livello del ventricolo destro in regione epicardica. Il flusso di corrente è stato mantenuto per 3 minuti per prevenire una depolarizzazione spontanea e l'arresto circolatorio è stato mantenuto per 10 minuti. Durante questi minuti il cervello poteva essere perfuso attraverso la cannula 26G posta in carotide oppure no, mantenendo quindi un arresto di circolo completo senza perfusione cerebrale. Al termine dei 10 minuti di arresto di circolo l'aorta è stata declampata e il CPB è stato nuovamente istituito ristabilendo un flusso adeguato come prima dell'arresto di circolo. In tutti i ratti sottoposti a questa procedura il cuore tornava spontaneamente a contrarsi con ritmo sinusale circa 10-15 minuti dopo il declampaggio e l'inizio della

riperfusion, successivamente il ratto veniva mantenuto in assistenza totale con il CPB per 60 minuti, successivamente questo veniva sospeso e veniva completato lo svezzamento prima del prelievo del cervello.

Tutti gli animali quindi hanno ricevuto lo stesso tipo di chirurgia, lo stesso tipo di cannulazione e sono stati collegati al circuito del CPB, tutti hanno subito 10 minuti di arresto di circolo e una riperfusione di 60 minuti prima di essere sacrificati.

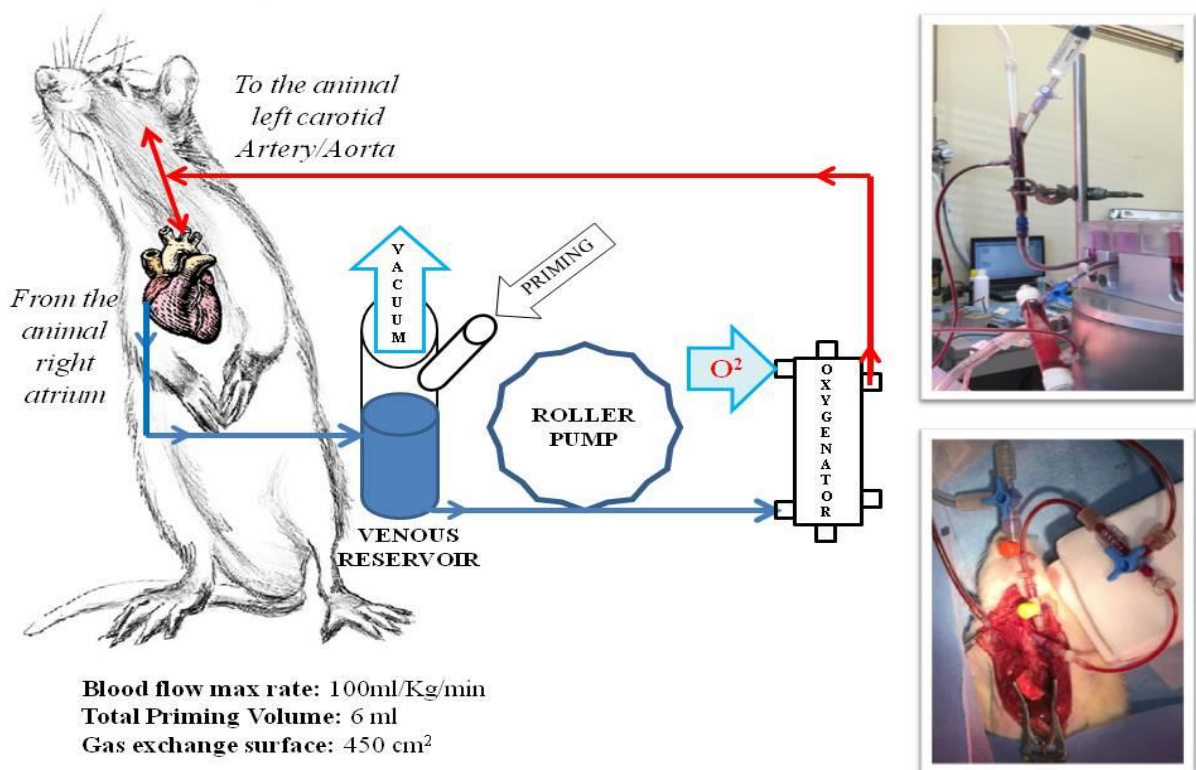


Figura 13: Schema del circuito costituente la circolazione extra corporea. Nella foto in alto a destra un dettaglio del circuito che comprende il reservoir venoso, la pompa roller e l'ossigenatore. Nella foto in basso a destra dettaglio della cannulazione, una cannula 5 Fr inserita in atrio destro attraverso vena giugulare, e due cannule da 24G e 26G inserite in carotide

MODELLO DI ARRESTO CARDIACO DA IPOTERMIA ACCIDENTALE E RISCALDAMENTO CON ECLS

Prima di procedere con isolamento e cannulazione degli accessi vascolari necessari per l'inizio del CPB l'animale viene messo in posizione supina sul tavolo operatorio e avvolto con un cuscinetto di gel precedentemente congelato fino al raggiungimento di una temperatura rettale di 15°C. Al raggiungimento di queste basse temperature il tracciato elettrocardiografico rileva un ritmo variabile tra un ritmo di fibrillazione ventricolare, marcata bradicardia (20 bpm) o asistolia. Tutte condizioni di arresto cardiaco o comunque di instabilità emodinamica e bassa portata cardiaca, la pressione arteriosa media rilevata in queste fasi variava tra 40mmHg e 20 mmHg. A questo punto veniva rimosso il cuscinetto e spento il ventilatore, e il ratto veniva lasciato in stato di arresto cardiaco ipotermico per 60 minuti (Figura 14).



Figura 14: Fase di raffreddamento del ratto.

Durante la fase di arresto cardiaco si procedeva al collegamento del ratto al circuito del CPB. Posto l'animale in posizione supina su una superficie termo isolante, la superficie toracica e la superficie ventrale del collo vengono rasate e la cute è disinfettata con clorexidina. La vena giugulare esterna destra viene quindi isolata e viene inserita una cannula del diametro di 5 Fr e avanzata per tutta la sua lunghezza sufficiente ad arrivare a livello dell'atrio destro dell'animale (la posizione della cannula viene eventualmente modificata per ottenere il miglior drenaggio venoso possibile in corso di CPB). L'arteria carotide comune destra viene invece incannulata con un catetere 24 G, fatto avanzare fino all'arco aortico e quindi collegato alla linea di perfusione arteriosa del circuito (Figura 15). Al momento dell'inserimento del catetere venoso viene somministrata la dose di bromuro di rocuronio 1-2 mg/kg e vengono inoltre somministrate 500 UI/Kg di eparina. In questo modello sperimentale non si rende necessaria l'apertura del torace in quanto non è necessario far arrestare il cuore con un

fibrillatore ma è l'ipotermia profonda ad indurre l'arresto cardiaco. Rispetto ai modelli con torace aperto il sanguinamento è notevolmente ridotto rendendo più stabile i flussi del CPB durante l'esperimento con necessità di minori riempimenti volumetrici e con migliori valori all'emogas durante e alla fine dell'esperimento.

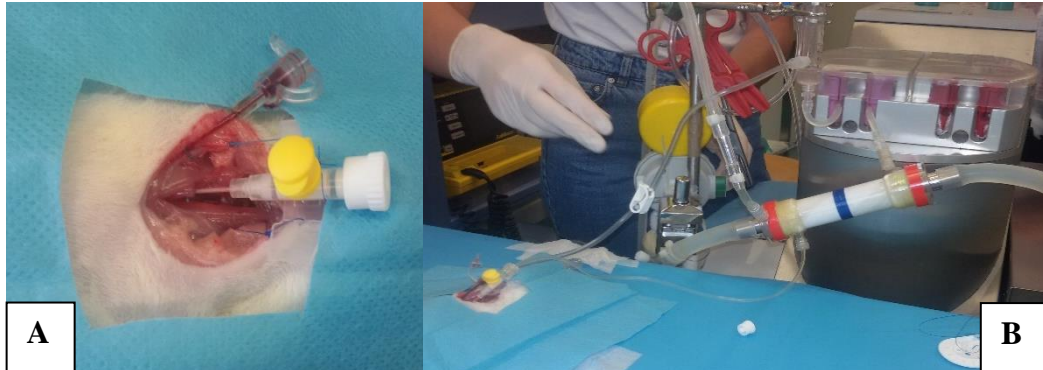


Figura 15. A) Cannule venosa inserita nella vena giugulare destra e cannula arteriosa inserita nella arteria carotide destra. B) Circuito CPB collegato a scambiatore di calore.

Il circuito di circolazione extracorporea (Figura 16) è costituito da una pompa a rulli (Stöckert SIII, Sorin, Germania), un ossigenatore a fibre cave con caratteristiche industriali standard (Sorin, Mirandola, MO, Italia), un vuoto regolatore con una pressione di -30/-40 cmH₂O per facilitare il drenaggio venoso, il tutto collegato da tubo di plastica di 1,6 millimetri di diametro interno. Il volume totale di riempimento del circuito extracorporeo compreso l'ossigenatore, è stato di 6 ml e costituito da 50 % soluzione colloidale e 50% Ringer lattato, la superficie di scambio del gas era di 450 cm² e la superficie di scambio termico di 15,8 cm². Una volta preparati gli accessi venosi e arteriosi il ratto è stato collegato al circuito del CPB e mantenuto con una portata di 80-100ml/kg/min e un range di pressione arteriosa media di 70-90 mmHg.

Il riscaldamento del circolo veniva ottenuto utilizzando uno scambiatore di calore, in grado di raggiungere una temperatura massima di 45°C. Il gradiente termico viene regolato in base alla velocità del riscaldamento che si vuole ottenere fino al raggiungimento dei 35°C di temperatura corporea. Qualora necessario si provvede anche al riscaldamento topico con lampada calda ad infrarossi. Si eseguono dei prelievi arteriosi per la valutazione emogasanalitica prima di iniziare la procedura, per ottenere valori basali, quindi al completamento del periodo di arresto cardiaco ipotermico, a metà della fase di riscaldamento e alla conclusione della stessa. Tutti gli animali quindi hanno ricevuto lo stesso tipo di chirurgia, lo stesso tipo di cannulazione e sono stati collegati al circuito del CPB, tutti hanno subito 60 minuti di arresto di circolo e una riperfusione di 90 minuti prima di essere sacrificati.

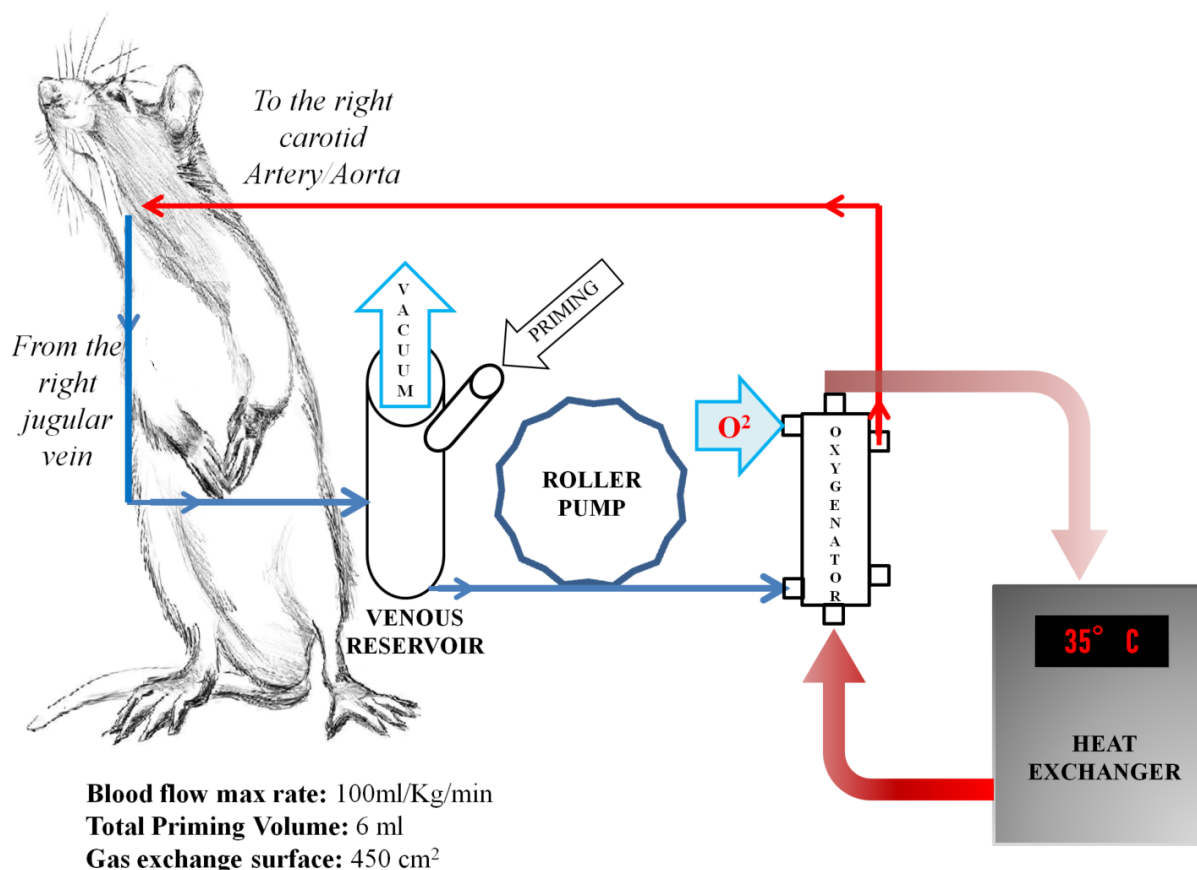


Figura 16: Schema del circuito costituente la circolazione extra corporea. In questo caso il torace rimane chiuso il ratto è collegato al CPB attraverso cannulazione di vena giugulare destra ed arteria carotide destra. Il circuito è inoltre collegato ad uno scambiatore di calore per permettere il riscaldamento graduale dopo ipotermia profonda.

3.2 NUMEROSITA' DEI CAMPIONI

Ogni studio effettuato è stato prima approvato dal comitato tecnico scientifico del CIRSAL e poi approvato dal Ministero della Salute. Per l'approvazione è fondamentale il rispetto del principio delle 3 R: rimpiazzare (replacement), ridurre (reduction) e rifinire (refinement).

Per poter definire il numero minimo di soggetti utili ai fini degli esperimenti abbiamo calcolato il potere statistico dello studio usando dati preliminari sulla concentrazione di Caspasi 3, uno dei parametri più significativi per determinare il grado di morte cellulare apoptotica. Si ritiene che la distribuzione di questo parametro sia approssimativamente normale. Si pianifica di verificare l'ipotesi nulla di uguaglianza dei valori medi dell'outcome nei gruppi sperimentali mediante il metodo statistico della one-way ANOVA e il relativo test F. Negli esperimento si è inoltre interessati a rilevare effetti di intensità medio/alta con un effect size (f di Cohen) pari o superiore a $f=0.33$. Considerando un errore di prima specie pari

al 5% ed una potenza pari all'80%.

Si consideri inoltre che l'esecuzione degli esperimenti richiede sempre fini tecniche di microchirurgia, e un errore tecnico che induca una perdita di volume ematico circolante può compromettere il risultato del singolo esperimento che quindi necessiterà di essere nuovamente eseguito. Per questo motivo per ogni esperimento la numerosità campionaria necessaria è stata aumentata a fini precauzionali del 20%.

Inoltre, l'introduzione durante il corso degli esperimenti di nuove tecniche di analisi e necessità di ripetizione degli esperimenti per poter ottenere nuovi campioni ha portato ad un ulteriore incremento degli animali inizialmente previsti.

3.3 PRELIEVI DEI TESSUTI ED ANALISI

L'analisi del cervello alla ricerca degli effetti neuro protettivi è cambiata nel corso degli studi, non solo per un'evoluzione e cambio delle tecniche diagnostiche, ma a volte semplicemente per la mancanza di disponibilità da parte dei collaboratori addetti alle analisi tissutali, o per l'assenza di disponibilità degli strumenti utili per l'analisi. Così se da una parte si è passati dalla sola istologia con ematossilina-eosina all'immunoistochimica e all'immunofluorescenza ottenendo risultati più significativi, dall'altra non è stato sempre possibile effettuare le analisi di biologia molecolare sui campioni congelati (che sono e rimangono da analizzare nel nostro freezer -80°C) oppure non è stato possibile effettuare le indagini con risonanza magnetica a causa dei lavori di ristrutturazione a cui sono stati sottoposti gli Istituti Biologici negli ultimi 2 anni.

Di seguito vengono spiegate le analisi a cui abbiamo sottoposto i cervelli nei diversi protocolli, non in tutti i protocolli sono state eseguite tutte le analisi che sarebbero state possibili e non sempre i risultati ottenuti e mostrati sono quelli definitivi.

CAMPIONI CONGELATI

Al termine del periodo di riperfusione tutti i ratti vengono sacrificati e il cervello viene prelevato rapidamente attraverso craniotomia posteriore. I campioni prelevati vengono immediatamente posti in azoto liquido e successivamente conservati nel freezer -80°C.

Per la valutazione della protezione cerebrale sono stati presi in considerazione diversi indici biochimici e analizzati dal Dott. G. Tong PhD presso Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie Deutsches Herzzentrum Berlin. Si sono analizzate le fasi più precoci

dell'attivazione genica attraverso la ricerca di specifici mRNA che indicassero l'attivazione di un pattern anti o pro-infiammatorio e anti o pro apoptotico.

Western Blot

Per l'analisi western blot sono stati scongelati i campioni in ghiaccio e per ciascuno (20 µg proteine totali) aggiunto il volume appropriato di loading buffer contenente beta-mercaptoetanolo e blu di bromofenolo. Ciascun campione è stato denaturato a 95- 100°C per 5 minuti e caricato in gel. In seguito è stata eseguita corsa elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis): le proteine denaturate, ridotte e cariche negativamente migrano verso il polo positivo per effetto del campo elettrico applicato. Si è proceduto quindi a electroblotting delle proteine risolte su membrana di PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) con metodo voltaggio costante: 70 V, 300 mA e saturazione dei siti aspecifici mediante incubazione della membrana in Blocking solution (2,5-5% BSA in TBS-T) in lenta agitazione per 45 minuti a temperatura ambiente. La membrana è stata poi incubata con l'appropriata soluzione di Ab primario, specifico per la proteina di interesse e lasciata in agitazione overnight a 4°C. IL giorno seguente sono stati eseguiti 3 lavaggi con soluzione TBS-T 1X da 5 minuti ciascuno in vigorosa agitazione al termine di questa fase la membrana è stata incubata con l'appropriata soluzione di Ab secondario coniugato con HRP (HorseRadish Peroxidase) per 1 ora e 30 minuti in lenta agitazione a temperatura ambiente. Si sono poi nuovamente eseguiti 3 lavaggi con soluzione TBS-T 1X da 5 minuti ciascuno in vigorosa agitazione ed è stato rilevato il segnale mediante chemiluminescenza (ECL-Enhanced ChemiLuminescence).

Al termine di queste procedure è stata effettuata analisi densitometrica e quantificazione dei blots mediante Image J software (NIH).

Real Time PCR

Per l'analisi PCR invece dopo la polverizzazione con pestello del tessuto cerebrale congelato si è provveduto all'omogenizzazione in Buffer di lisi. L'RNA cellulare totale è stato isolato mediante estrazione con acido fenolo / cloroformio e trattato con DNAsi I (Qiagen, Hilden, Germania). I campioni sono stati centrifugati per consentire l'eliminazione dei residui cellulari. Successivamente, 500 ng di RNA sono stati retrotrascritti a 42 °C per 1 h con 200 U di un enzima DNA polimerasi RNA dipendente (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, Madison, WI) in 35 µl di miscela di reazione. Il prodotto PCR delle proteine analizzate è stato quantificato in real-time, utilizzando sonde oligonucleotidiche

marcate con colorante fluorogenico. Real-time PCR è stata effettuata in tre tempi e ripetuta due volte per ogni campione utilizzando un volume reattivo totale di 11 microl contenente 5 microl di 2 x KAPA PROBE FAST qPCR Mastermix (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germania), 2,5 microl di 2 microM di un mix di oligonucleotidi (primer forward e reverse, BioTeZ Berlin-Buch, Germania), 0.5 microM di sonde, e 1 ng del modello di cDNA della proteina analizzata (diluito in acqua RNase-free a 3 microl). L'amplificazione PCR è stata eseguita in piastre da 96 pozzetti per 40 cicli con ciascun ciclo a 94°C per 15 s e a 60° C per 1 min. La reazione è stata condotta con il StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germania) e dati di fluorescenza sono stati convertiti in valori threshold cycle (Ct) e infine quantificati.

CAMPIONI IN PARAFORMALDEIDE (PFA)

Dopo prelievo del cuore un'arteria carotide viene cannulata con ago cannula 24G utilizzando lo stesso foro di entrata della cannula usata per la perfusione del CPB, questa volta però la cannula è diretta verso l'encefalo. 10 ml di tampone fosfato salino (PBS) vengono iniettati per lavare via il sangue presente, a seguire vengono iniettati 10 ml di PFA. Dopo fissaggio del cervello si effettua craniotomia posteriore e si asporta il cervello intero e si posiziona in provetta contenente PFA.

Lo studio *istopatologico* ed *immunoistochimico* è stato svolto ad opera della Dott. F Merigo presso il Dipartimento di Anatomia Istituti Biologici, Università di Verona.

La studio di *immunofluorescenza* è stato possibile grazie alla collaborazione con le dottoresse della sezione di Farmacologia dell'Università degli studi di Verona (Dr.ssa Ilaria Decimo, Dr.ssa Annachiara Pino, Dr.ssa Sissi Dolci).

Ematossilina-Eosina

I campioni in formalina sono stati sottoposti a 3 lavaggi in PBS (Phosphate buffered saline) della durata di 30 minuti ciascuno. In seguito, sono stati posti in una soluzione di PBS con 30% di saccarosio (sucrose for microbiology, ACS reagent, ≥99.0%; Fluka Analytical) sino a completa perfusione (evidenziata dall'aumento di densità dei campioni che, inizialmente galleggianti, si depositano sul fondo delle provette).

I campioni sono quindi stati congelati e tagliati mediante l'impiego di crio-microtomo (Reichert-Jung Cryo.Microtome 1206 and Frigomobil) montante lame mono-uso (Leica 819,

Low Profile Microtome Blades, Leica). Sul ripiano congelante del criomicrotomo sono stati posti alcuni millilitri di 30%Scr-PBS che si sono rapidamente congelati. Spianati nel processo di congelamento se ne è individuato una base ottimale per il posizionamento e il fissaggio dei campioni al supporto. Questi, prima di essere fissati sulla base di 30%Scr-PBS sono stati sezionati lungo il solco cerebro-cerebellare per ottenere una base di appoggio piatta. Il posizionamento sul supporto è stato eseguito avendo cura di ottenerne sezioni coronali. Alcune gocce di 30%Scr-PBS sono state versate sul campione ormai coerente con l'apparecchio per ottenerne un guscio che lo rafforzasse nell'atto del taglio. Il campione è stato coperto sino a completo congelamento per proteggerlo dal vapore acqueo ambientale. La fase di congelamento si è svolta con temperatura della base di circa -38°C . Lo spessore di ciascuna fetta è stato di $40\text{ }\mu\text{m}$ e la temperatura di taglio compresa fra -35°C e -20°C , modulata progressivamente nel corso dell'operazione per ottimizzarne la resa. Le fette ottenute sono state adagiate in una matrice di pozzetti 4x6 (Nunc Delta Surface, Thermo Scientific) contenenti soluzione PBS. Le fette sono state adagiate in maniera progressiva in maniera che ciascun pozzetto contenesse fette rappresentative dell'encefalo nel suo insieme distanziate l'un l'altra di $960\text{ }\mu\text{m}$ ($40\text{ }\mu\text{m} \times 24$).

Le sezioni di un pozzetto, per ciascun cervello, sono state montate su vetrini porta oggetto gelatinizzati e lasciati asciugare in aria ambiente per 24 h. la gelatinizzazione dei vetrini ha consentito la salda adesione delle sezioni ai vetrini nel corso dell'asciugatura. La gelatinizzazione ha richiesto un primo lavaggio in acqua bidistillata (Milli-Q, Millipore) addizionata al 2% con soluzione pulente (mantenuti in immersione per una nottata). Cui ha fatto seguito lavaggio in etanolo 70% (3 ore) e in acqua bidistillata (30 minuti). I vetrini così puliti sono stati immersi in soluzione cromalin per 7-8 minuti e fatti asciugare circa 1 ora. Questa fase è stata ripetuta 3 volte. Infine, i vetrini sono stati lasciati ad asciugare per una notte. La soluzione cromalin è ottenuta facendo disciogliere 0,5% di gelatina in acqua bidistillata mediante riscaldamento e agitazione. Quindi si aggiunge 0,1% di potassio cromo solfato dodecaidrato.

Successivamente è stata effettuata colorazione con ematossilina ed eosina. Dopo avere eseguito idratazione delle fette si è proceduto con lavaggio in ematossilina della durata di 6 minuti. l'eccesso di colorante è stato eliminato mediante lavaggio non diretto in acqua corrente della durata di 2 minuti. In seguito, ciascun vetrino, singolarmente, è stato immerso in eosina (precedentemente filtrata) per 30 secondi. Dopo un secondo lavaggio in acqua corrente si valutata la correttezza della colorazione tramite microscopio ottico. Si è poi proceduto alla disidratazione e al completamento tramite lavaggi in alcol, xilene e

posizionamento di eukitt e vetrino copri-oggetto.

Le sezioni di tessuto così preparate sono quindi state analizzate con microscopia ottica.

Immunoistochimica

Dopo il prelievo, i campioni venivano fissati in paraformaldeide e processati tramite inclusione in paraffina utilizzando i metodi standard. I preparati sono stati sezionati con il microtomo rotativo e le sezioni, dello spessore di 7 μm , raccolti su vetrini ricoperti con polilisina, quindi processati per l'immunoperossidasi e la doppia immunofluorescenza.

Colorazione. Le sezioni sono state sparaffinate e reidratate con passaggi successivi in alcol a concentrazione discendente fino all' H_2O . È stata poi eseguita una colorazione classica in Ematossilina-Eosina. Dopo opportuna disidratazione tramite immersioni in concentrazioni ascendenti di etanolo fino all'assoluto, le sezioni sono state poste in xilolo e successivamente protette con vetrino coprioggetti previa applicazione di alcune gocce di soluzione di montaggio.

Perossidasi-immunoistochimica. Le sezioni sono state sparaffinate e reidratate con passaggi successivi in alcol a concentrazione discendente fino all' H_2O , quindi passate in microonde a 800 W per cicli dai tre ai cinque minuti in 0.01 M tampone citrato (pH 6) per ottimizzare il recupero dell'antigene. Per la metodica immunoenzimatica è stato utilizzato il metodo "avidina-biotina" (ABC). L'attività della perossidasi endogena veniva bloccata dall'incubazione dei vetrini in 30 mL/L di H_2O_2 in metanolo per 30 minuti. Dopo ripetuti lavaggi in acqua distillata e tampone fosfato (PBS) 0.1 M pH 7.5, le sezioni vengono trattate con una soluzione bloccante (3 mL/L Triton X-100, 10 g/L bovine serum albumin BSA e 10 mL/L normal swine or rabbit serum), la soluzione veniva utilizzata per diluire gli anticorpi. Successivamente, le sezioni venivano incubate con l'anticorpo primario a 4° C per una notte e quindi venivano fatte reagire con l'anticorpo secondario biotinilato per 1 ora a temperatura ambiente (Tabella VIII). L'immunoreazione veniva rilevata utilizzando Vectastatin Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Unites States) e quindi visualizzata con 3.3'-diaminobenzidina tetracloridrato (Dako, Milan, Italy) per 5-10 minuti. Infine, le sezioni venivano montate in Entellan (Merck, Milan, Italy). Le sezioni montate come sopra, ma senza l'anticorpo primario, venivano utilizzate come controllo negativo.

Le sezioni sono state in seguito osservate al microscopio ottico Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) equipaggiato con fotocamera digitale (DKY-F58 CCD, JVC, Yokohama, Japan). Le immagini elettroniche sono state analizzate e processate utilizzando il software Image-ProPlus 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Immunofluorescenza

I cervelli prelevati dai soggetti sottoposti alla sperimentazione vengono analizzati mediante analisi immunoistochimica. Si tratta di un metodo specifico e altamente sensibile che consente la rilevazione di determinati antigeni presenti nel tessuto in campioni di dimensione relativamente piccole. Su una sezione di tessuto opportunamente preparato si pone l'anticorpo specifico per l'antigene da analizzare ottenendo una reazione immunitaria antigene-anticorpo. Si possono utilizzare sia anticorpi direttamente coniugati a molecole fluorescenti (immunofluorescenza diretta), oppure la reazione antigene-anticorpo viene evidenziata utilizzando un secondo anticorpo, coniugato a fluorocromo, specifico per il primo anticorpo (immunofluorescenza indiretta). Il campione "colorato" viene quindi analizzato mediante microscopio a fluorescenza.

Per questa procedura, i campioni prelevati vengono inizialmente conservati in formalina ad una temperatura di -20°C.

Per procedere con le analisi i campioni vengono rimossi dalla soluzione e lasciati asciugare a temperatura ambiente per qualche minuto. Vengono quindi ricoperti con il gel OCT e posti in ambiente freddo in modo da fissare e congelare i tessuti. L'OCT è una resina che a temperatura ambiente ha una consistenza gelatinosa ma a temperatura fredda (dai 4°C) tende a solidificare; egli circonda l'organo proteggendolo dal trauma del congelamento e costituendo un supporto solido in modo da consentire il taglio.

Una volta solidificato, il cervello viene tagliato mediante il criostato ad una temperatura di circa -22°C in fette da 35µm poste su vetrini da microscopio; generalmente per ciascun campione vengono preparati circa 70 vetrini con 4/5 fette su ciascun vetrino, e conservati a -20°C fino alla seguente procedura. I passaggi successivi si differenziano a seconda della finalità delle analisi.

Per l'analisi del grado di infiammazione tissutale i vetrini vengono lavati in soluzione PBS 1X per 10 minuti e incubati per 30 minuti in soluzione bloccante (0,25% Triton X-100, 2% siero di albumina bovina in PBS 1X). In seguito, vengono incubati per una notte a 4°C con una soluzione costituita dagli anticorpi primari *anti-Iba1* (*Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1*) diluiti in soluzione bloccante (1:200). Questo anticorpo è specifico per le cellule della microglia, ovvero macrofagi specializzati nel tessuto di tipo nervoso, determinanti della prima e principale linea di difesa immunitaria del sistema nervoso centrale. La positività a questo tipo di marker indica quindi un'attivazione infiammatoria delle suddette cellule, e la sua quantità sarà indicativa del grado di infiammazione tissutale.

Il giorno successivo, le fette presenti sui vetrini vengono lavati 6 volte per 5 minuti ciascuno con soluzione bloccante e incubati in una soluzione anticorpale secondaria, composta da anticorpi secondari *d'asino anti-coniglio Alexa Fluor 488* disciolti in soluzione bloccante (1:500), a temperatura ambiente per 4 ore. Una volta aggiunti gli anticorpi secondari, i vetrini devono essere tenuti al buio in modo da non interferire con la funzionalità del fluoroforo. Trascorso il tempo necessario i vetrini vengono lavati tre volte per 5 minuti ciascuno con soluzione bloccante, quindi lavati nuovamente tre volte per 5 minuti ciascuno con PBS 1X. Terminato questo passaggio, vengono incubate per 10 minuti con DAPI (4,6-diammino-2-fenilindolo dicloridrato, Sonde Molecolari-Thermo Fisher Scientific, 1:3000) e TO-PRO (tmetc) (TO-PRO-3, Sonde molecolari - Thermo Fisher Scientific, 1:3000) per la colorazione dei nuclei. Come ultimo passaggio, le fette disposte sui vetrini vengono lavate con PBS 1X e ricoperti con ulteriori vetrini utilizzando 1,4-Diazabiccicloottano (DABCO, Sigma-Aldrich).

Per la misurazione dello stato ossidativo tissutale si procede alla preparazione del tessuto ai fini della quantificazione dei tioli. La quantificazione dei tioli è in relazione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quando la produzione di ROS nelle cellule supera la neutralizzazione da parte degli antiossidanti, la cellula è sottoposta a stress ossidativo. Lo stress ossidativo prolungato o eccessivo è dannoso, causando danni significativi al DNA o all'RNA, disattivazione degli enzimi e danni alle strutture cellulari che possono portare all'apoptosi. La produzione naturale di un antiossidante, il glutatione (GSH), nelle cellule agisce come un meccanismo di difesa per contrastare gli effetti avversi dello stesso ossidativo cellulare. Di conseguenza la quantificazione dei Tioli possono essere utilizzati per rilevare i gruppi tiolici nel glutatione e monitorarne il tasso di produzione nelle cellule come risposta a livelli elevati di stress ossidativo da attività cellulari.

Per questa analisi vengono presi in considerazione 3 campioni appartenenti al gruppo di controllo e 3 campioni appartenenti al gruppo dei trattati. Le fette del cervello di 35µm presenti sui vetrini vengono lavate in soluzione PBS 1X per 10 minuti e incubate per 1 ora con soluzione PBS contenente 4mM di Tris(2-carbossietil) fosfina cloridrato (TCEP), reagente utilizzato per la riduzione selettiva dei disolfuri. Successivamente vengono incubate con 250mL di dimetilsolfossido (DMSO) contenente 7-dietilammino-3-(4-maleimidilfen)-4-metil-cumarina (CPM) alla concentrazione di 4mg/mL, per un'ora e mezza. Il CPM è una sonda fluorescente, e viene utilizzata per il monitoraggio del rilascio dei tioli mediante la colorazione delle proteine nucleolari.

Infine, le fette disposte sui vetrini vengono lavate con PBS 1X e chiuse con vetrino copri oggetto utilizzando 1,4-Diazabiccicloottano.

Segue la fase di analisi al microscopio a fluorescenza.

Le cellule immunomarcate Iba1 sono state esaminate al livello microscopico a fluorescenza, in associazione ai nuclei marcati NeuN. Sono stati presi in considerazione tre campioni per il gruppo di controllo e tre campioni trattati con ossido nitrico, analizzando due vetrini per ciascun campione e considerando come punto di riferimento 5 zone specifiche, individuate ed analizzate al microscopio per ciascuna fetta.

Per la quantificazione dei tioli sono state catturate porzioni dell'intera corteccia per ciascuna fetta presente sui vetrini.

Le immagini ottenute per ogni area vengono quindi trasferite al computer per essere analizzate. La valutazione del contenuto è stata eseguita utilizzando il software ImageJ (U.S. National Institutes of Health) in condizioni cieche. Per le diverse quantificazioni è stato delimitato, nelle sezioni colorate, una regione di interesse (ROI – Region of Interest) e impostando una soglia per valutare la percentuale del livello medio di grigio in ciascuna area (pixel positivi a una colorazione specifica nella regione considerata in confronto ai pixel dell'intera area della regione presa in considerazione). È stata così quantificata la percentuale delle aree marcate con gli anticorpi d'interesse.

ELETTROENCEFALOGRAMMA

Nel protocollo che prevedeva la perfusione cerebrale selettiva in alcuni ratti del peso di circa 400 gr e dell'età di circa 5 mesi è stato possibile effettuare una registrazione continua dell'EEG durante l'esperimento. Una settimana prima dell'esperimento finale con CBP e arresto di circolo questi animali sono andati incontro a procedura chirurgica, previa anestesia con isofluorano 1,5-2% (Abbot Laboratories, Queenborough, UK), per l'impianto bilaterale di elettrodi intracerebrali di argento isolati con teflon. Gli animali sono stati posti nell'apparecchio stereotassico e gli elettrodi sono stati posti bilateralmente nel Talamo: AP=-6; ML=-3,5; DV=-5,8 mm relativamente al bregma, Le coordinate sono state calcolate per ogni animale in accordo con la distanza bregma-lambda. Inoltre, sono stati posti elettrodi epidurali bilateralmente sopra la corteccia frontale (AP=-1,5; ML=-0,4mm relativamente al bregma) e parietale (AP=-4,5; ML=-4,5mm relativamente al bregma). Tutti gli elettrodi sono stati poi montati sul connettore prima dell'impianto finale. Per una migliore fissazione dell'impianto sono state inserite 2 viti nel cranio, e poi è stata usato cemento acrilico dentale. Successivamente sono stati svegliati e riportati nello stabulario e trattati con antidolorifico e antibiotico per 2 giorni.

Dopo una settimana è stato registrato un EEG basale per 5 minuti a ratto sveglio per eliminare disturbi del segnale e interferenze causate dall'ambiente e dai macchinari presenti in laboratorio, dopo l'anestesia e l'intubazione ogni animale è stato collegato attraverso l'amplificatore a 8 canali BS al PowerLab 8/35 (AD Instruments) e il segnale delle 6 tracce EEG era visualizzato in tempo reale sul programma LabChart8 (AD Instruments) sul PC. La registrazione è stata eseguita per tutta la durata dell'esperimento con una banda da 0.5Hz a 1kHz con una frequenza di campionamento di 2kHz. Tutte le analisi EEG sono state eseguite in seguito off-line, utilizzando un programma di analisi Matlab con uno script custom made. Il programma permetteva l'analisi spettrale del segnale EEG (Power Spectrum Density o PSD) per ogni animale e poi ha fornito un'analisi dell'attività media per ciascun gruppo. Tale metodo di indagine prevede la trasformazione matematica del segnale stesso dal dominio del tempo a quello delle frequenze, questo diventa possibile attraverso un calcolo matematico alla cui base vi è l'integrale di Fourier, è così possibile misurare la potenza espressa da una delle bande di frequenza che compongono l'EEG in un dato tempo e stabilire quanto ciascuna delle bande pesi in termini percentuali nella composizione del segnale. L'utilizzo dei sistemi di analisi spettrale consente anche di costruire dei grafici che esprimono l'andamento nel tempo dei valori di potenza relativa delle varie bande EEG. In questo modo otteniamo dei grafici in cui la frequenza del segnale è misurata nel tempo, semplificando possiamo considerare momenti di intensa frequenza come momenti di forte attività elettrocorticale mentre momenti di bassa frequenza di segnale come momenti di bassa o nulla attività elettrocorticale.

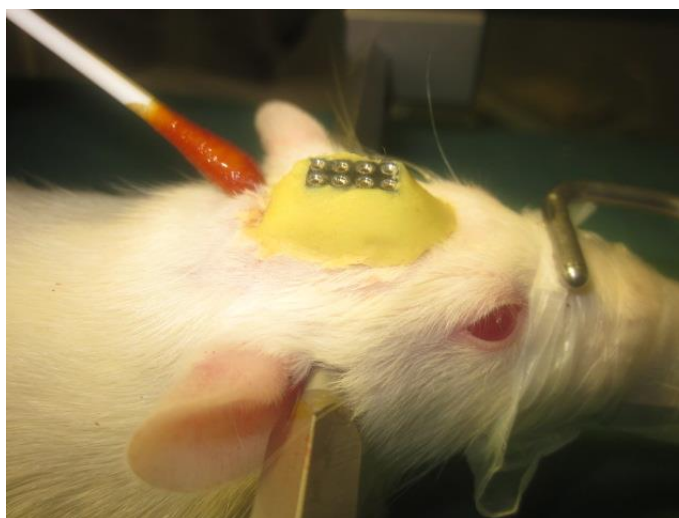


Figura 17: Elettrodi cerebrali ed epidurali impiantati e fissati al cranio per la registrazione dell'EEG.

RISONANZA MAGNETICA

Alcuni ratti sono stati fatti sopravvivere dopo l'esperimento per poter essere sottoposti alle indagini di risonanza magnetica, eseguiti 2 e 24 ore dopo la fine dell'esperimento. La sopravvivenza dell'animale è stata possibile grazie alla tecnica del CPB a torace chiuso riducendo la chirurgia sull'animale e permettendo un adeguato risveglio ed estubazione con adeguata analgesia. Il ratto viene quindi trasportato presso il Dipartimento di Anatomia dell'Università degli Studi di Verona addormentato con isofluorano in maschera e sottoposto a RMN encefalo dalla Dott.ssa Elena Nicolato un'altra RMN viene eseguita il giorno successivo a 24 ore dall'evento ischemico. I dati vengono poi analizzati e quantificati attraverso elaborazione con software dedicato dal Dott. Pietro Bontempi e Dott.ssa Pasquina Marzola.

Sono state eseguite una prima valutazione con mezzo di contrasto per poter valutare il grado di perfusione cerebrale, e in particolare dei gangli basali, e successivamente si è calcolata la diffusività media (*mean diffusivity*, MD) della stessa area, quale indicatore del grado di edema cerebrale.

Il gradiente di perfusione cerebrale è stato misurato tramite la valutazione delle immagini acquisite prima e dopo la somministrazione di contrasto, impiegando la formula $[(\text{post-pre})/\text{pre}]$. I valori ottenuti sono espressi come numeri negativi, i quali avvicinandosi allo zero indicano un maggior grado di perfusione.

La seconda indagine effettuata riguarda la diffusività media, eseguita sempre a 2 e 24 ore. Il tensore di diffusione è un parametro della risonanza magnetica che sfrutta il peculiare comportamento delle molecole d'acqua a livello delle fibre nervose. Normalmente, infatti, queste molecole sono dotate di cosiddetta isotropia, cioè tendono a muoversi con eguale probabilità in ciascuna direzione dello spazio. La tipica struttura delle fibre nervose, però, fa sì che queste molecole siano spinte a muoversi principalmente in una determinata direzione, acquisendo in questo caso l'anisotropia, che viene per l'appunto sfruttata in risonanza magnetica per la creazione di immagini tridimensionali che riproducono la disposizione delle fibre stesse. Nel caso particolare, la diffusività media viene applicata nel contesto del meccanismo visto per la generazione del tensore di diffusione per stabilire il grado di motricità indipendente delle molecole nel contesto di un voxel, unità di misura del volume, ossia controparte tridimensionale del pixel. In sostanza ciò rende idea della quantità di molecole d'acqua presente nel tessuto analizzato, oltre che della loro libertà di movimento, riflettendo in termini clinici il grado di edema cerebrale.

4 IPOTERMIA FARMACOLOGICA

4.1 SCOPO DELLO STUDIO

Alla luce degli effetti avversi sistemici del trattamento con ipotermia convenzionale, questo studio vuole indagare gli effetti dell'ipotermia indotta farmacologicamente a livello cerebrale. In particolare, ci si avvale dell'uso di un farmaco della classe dei cannabinoidi: WIN 55.212-2. Lo scopo dello studio è comparare l'effetto di questo agonista dei recettori CB1/CB2 all'effetto dell'ipotermia moderata terapeutica indotta per via topica e alla normotermia in uno stesso modello murino di arresto cardiaco con supporto cardiocircolatorio extracorporeo.

4.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO

Al momento dell'arresto cardiaco i ratti sono stati randomizzati in tre gruppi:

NORMOTERMIA (NT): la temperatura mantenuta entro il range 36 - 37°C mediante lo scambiatore di calore e lampada termica. È stata somministrata una soluzione placebo di fisiologica in infusione continua (n=10);

IPOTERMIA (HT): la temperatura è stata mantenuta entro il range 32° - 33°C mediante raffreddamento attivo con impacchi di ghiaccio. È stata somministrata una soluzione placebo di fisiologica in infusione continua (n=10);

IPOTERMIA FARMACOLOGICA (PH): è stato somministrato in infusione continua WIN 55.212-2 al dosaggio di 1mg/kg/h che ha permesso una progressiva riduzione della temperatura pur evitando un raffreddamento attivo (n=10);

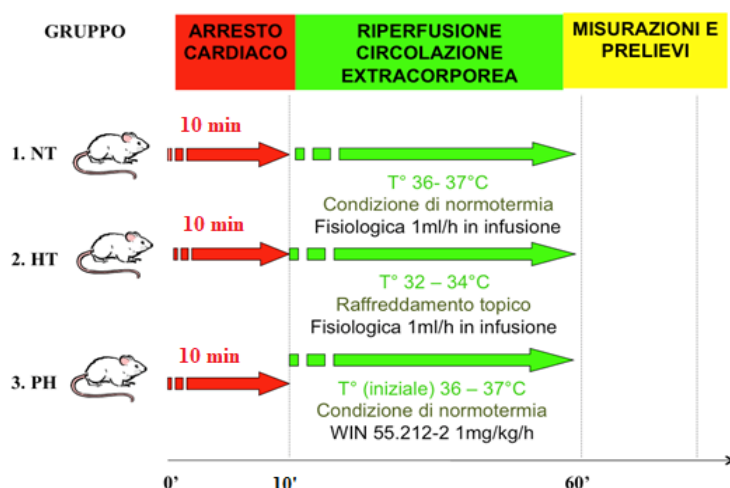


Figura 18: Protocollo sperimentale. NT = arresto cardiaco normotermico; HT = arresto cardiaco con ipotermia topica; PH = arresto cardiaco con ipotermia farmacologica

4.3 RISULTATI

ABBASSAMENTO DELLA TEMPERATURA

Grazie all'utilizzo di una microsonda a termocoppia rettale è stato possibile monitorare la temperatura corporea degli animali per tutta la durata dell'intervento. Il gruppo NT ha mantenuto una temperatura costante attorno ai 36 - 37 °C grazie all'utilizzo di una lampada termica che impediva le dispersioni di calore. Il gruppo HT, invece, grazie al raffreddamento attivo ha raggiunto velocemente la temperatura target di 32- 34 °C che poi ha mantenuto per il resto dell'intervento. Infine, il gruppo PH ha visto un graduale ma progressivo abbassamento della temperatura dettato dall'effetto del farmaco pur mantenendo le condizioni del gruppo NT.

La temperatura raggiunta dopo un'ora nel gruppo PH non è propriamente quella considerata il target dell'ipotermia moderata ma si avvicina ai 34,5 °C. Conoscendo però la farmacocinetica del farmaco, il trend di riduzione della temperatura è conforme all'atteso e il target dei 32-34 °C verrebbe raggiunto dopo circa 110-130 minuti.

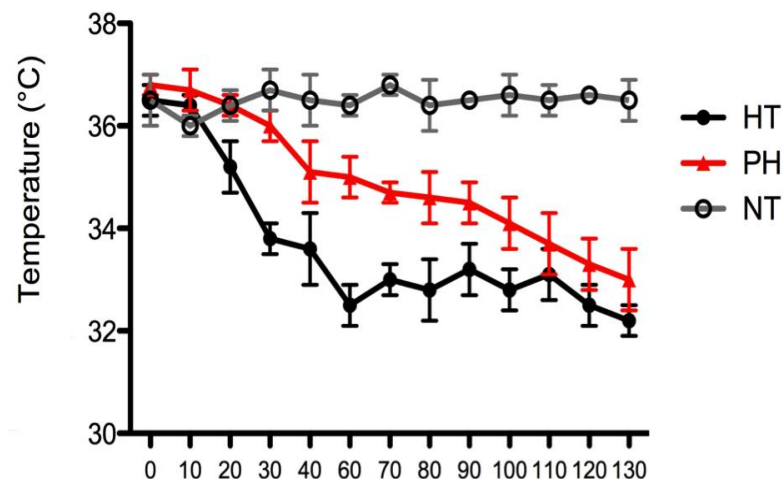


Figura 19: Variazione della temperatura corporea nei tre gruppi durante l'intervento.

PH: ipotermia farmacologica; HT: ipotermia topica; NT: normotermia.

LATTACIDEMIA

I lattati sono un indicatore biochimico affidabile del metabolismo anaerobio, aumentando in tutte le situazioni di ipoperfusione e anossia tissutale. Ne sono stati quindi misurati i valori nel sangue arterioso allo svezzamento dalla CEC, che hanno dimostrato un effetto protettivo del WIN 55.212-2 rispetto alla normotermia o all'ipotermia convenzionale. (Figura 20)

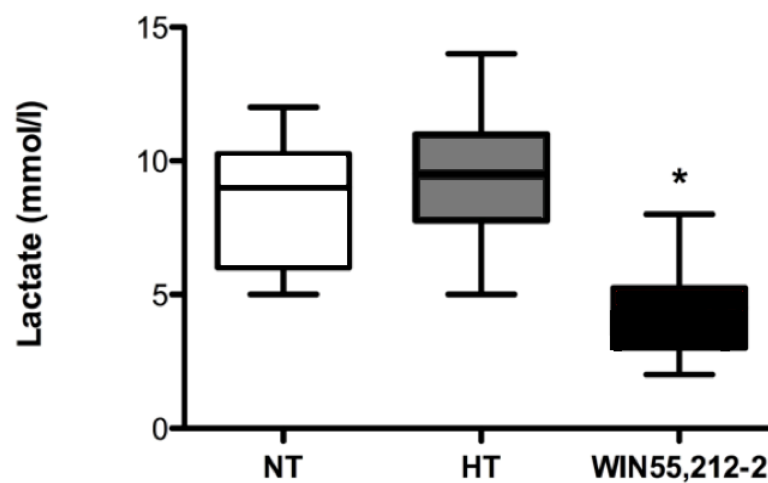


Figura 20: Confronto dei valori di lattato nei tre gruppi di studio da campione di sangue arterioso prelevato dopo lo svezzamento dal CPB. * $p < 0.05$ HT: ipotermia topica; NT: normotermia.

BIOLOGIA MOLECOLARE

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata con Kruskal-Wallis/Dunn's Multiple Comparison Post hoc Test ed i valori sono significativi per $p < 0.05$ (*).

RBM3 mRNA

RBM3 è una proteina di legame la cui sintesi è indotta dall'ipotermia e che si è scoperto avere un'importante funzione anti-apoptotica e quindi neuroprotettiva. Valutando i livelli di RBM-3 mRNA nei tre gruppi si riscontra come l'aumento di espressione del gene sia altamente significativo nel gruppo HT rispetto al gruppo NT, come risulta significativo anche nel gruppo PH rispetto allo stesso gruppo NT. (Figura 21)

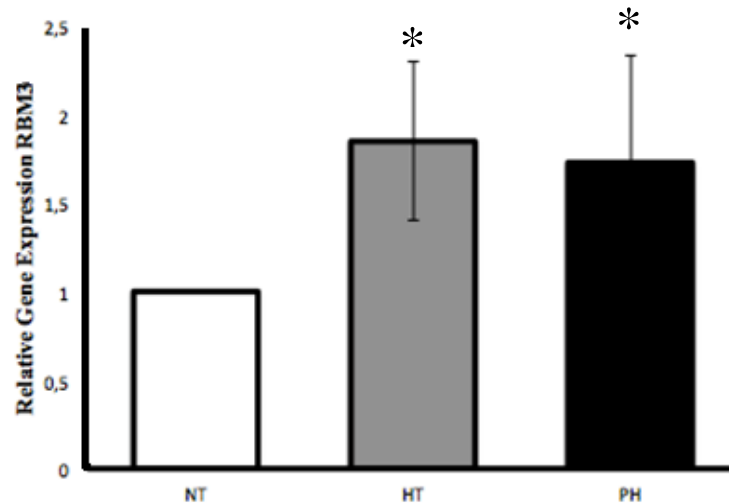


Figura 21: Valutazione nei tre gruppi del grado di espressione di RBM3 mRNA nei reperti cerebrali.
 NT = normotermico; HT= ipotermia topica; PH= ipotermia farmacologica. * $p < 0,05$

IL-10 mRNA

IL-10 è un' importante interleuchina anti-infiammatoria prodotta principalmente da monociti e linfociti T che in grado di inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α . I risultati ottenuti mostrano come sia nel gruppo HT che nel gruppo PH ci sia un aumento significativo a fine trattamento dei livelli di IL-10 mRNA rispetto al gruppo NT. (Figura 22)

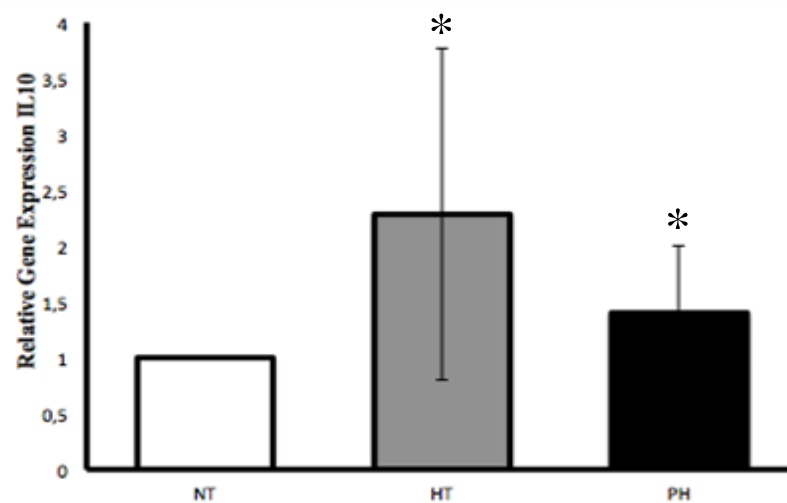


Figura 22: Valutazione nei tre gruppi del grado di espressione di IL 10 mRNA nei reperti cerebrali.
 NT = normotermico; HT= ipotermia topica; PH= ipotermia farmacologica. * $p < 0,05$

IL-6 mRNA

IL-6 è una citochina con attività proinfiammatoria e, in parte, anche antinfiammatoria. Dal punto di vista cerebrale è particolarmente importante nel mediare il danno infiammatorio in quanto è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica inducendo a livello ipotalamico la febbre e la sintesi di altri mediatori coinvolti nell'infiammazione. Osservandone l'espressione genica nel nostro studio si è evidenziata una riduzione del trascritto IL-6 mRNA nei gruppi trattati con ipotermia terapeutica o indotta farmacologicamente rispetto al gruppo normotermico, confermando il ruolo neuroprotettivo dell'ipotermia. (Figura 23)

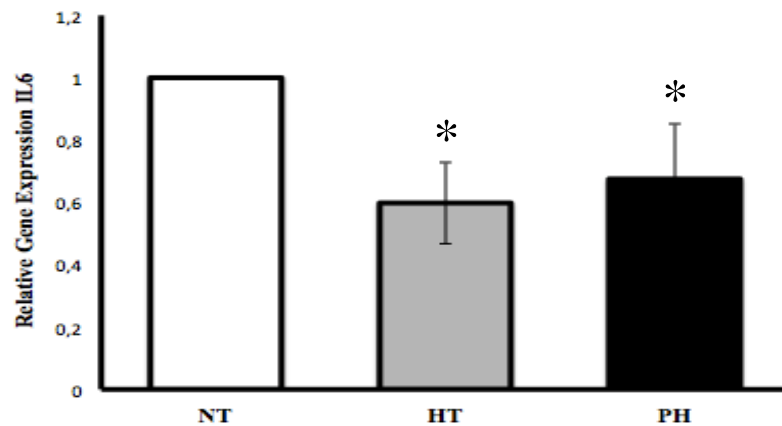


Figura 23: Valutazione nei tre gruppi del grado di espressione di IL 6 mRNA nei reperti cerebrali.
 NT = normotermico; HT= ipotermia topica; PH= ipotermia farmacologica. * $p < 0,05$

MCP- 1 mRNA

MCP-1 appartiene alla famiglia delle chemochine ed è deputata al reclutamento di monociti, linfociti T e cellule dendritiche nei siti di infezione ed infiammazione. Anche questo indice proinfiammatorio risulta avere un'espressione ridotta nei gruppi HT e PH rispetto al gruppo NT con valori paragonabili tra i due gruppi. (Figura 24)

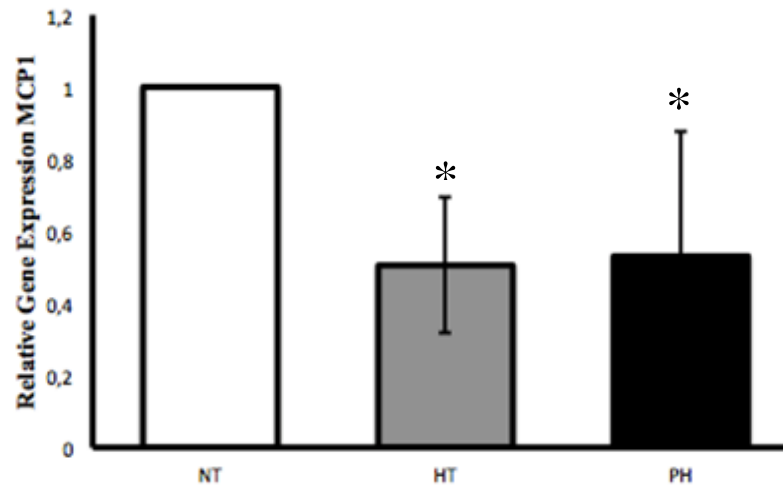


Figura 24: Valutazione nei tre gruppi del grado di espressione di MCP1 mRNA nei reperti cerebrali.

NT = normotermico; HT= ipotermia topica; PH= ipotermia farmacologica. * $p < 0,05$

iNOS mRNA

iNOS è una forma di Ossido Nitrico Sintasi inducibile che viene attivata da un evento ischemico e porta alla produzione di NO in eccesso. Questo può reagire con specie reattive dell'ossigeno e stimolare la risposta infiammatoria, fondamentali meccanismi per lo sviluppo del danno da ischemia-riperfusion. Il gruppo HT ha dimostrato una ridotta sintesi di iNOS mRNA rispetto al gruppo NT ($P = 0,0156$). Il gruppo PH inoltre si è dimostrato avere un'efficacia ancora maggiore rispetto al gruppo HT nel ridurre la sintesi di questo indice proinfiammatorio ($P = 0,0078$). (Figura 25)

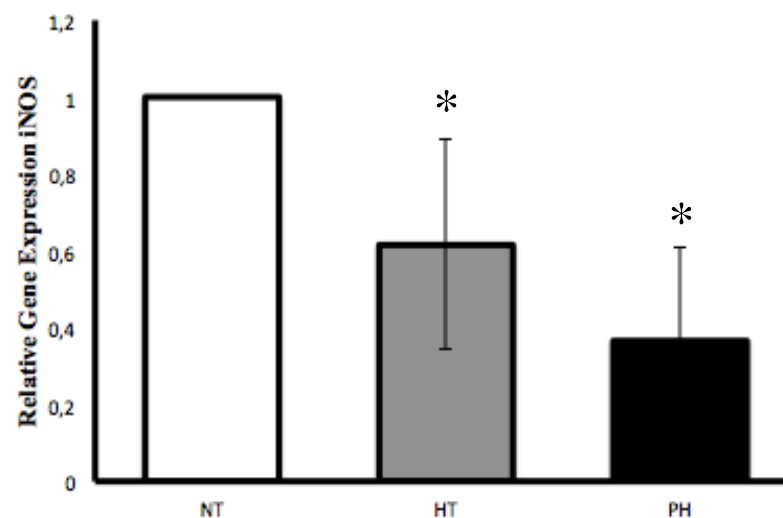


Figura 25: Valutazione nei tre gruppi del grado di espressione di iNOS mRNA nei reperti cerebrali.

NT = normotermico; HT= ipotermia topica; PH= ipotermia farmacologica. * $p < 0,05$

4.4 DISCUSSIONE

L'ipotermia terapeutica è ormai entrata a far parte della pratica clinica. A partire da due grandi studi del 2002^{20,21} l'interesse per l'ipotermia, soprattutto come mezzo di neuroprotezione, è andato via via aumentando, portando all'identificazione dei meccanismi alla base del ruolo terapeutico del raffreddamento. Mentre però il ruolo dell'ipotermia in ambito intraoperatorio cardiocirurgico è una realtà consolidata da tempo,¹⁵ solo da pochi anni è stato standardizzato l'utilizzo dell'ipotermia moderata dopo arresto cardiaco e successiva rianimazione cardiopolmonare,²⁵ seppur per pazienti ancora selezionati con livelli di evidenza diversi per pazienti rianimati da un arresto con ritmo defibrillabile e pazienti rianimati da ritmi non defibrillabili. Dal punto di vista neurologico i vantaggi sono innumerevoli: la riduzione del metabolismo, la riduzione degli effetti negativi del calcio intracellulare, la riduzione del rilascio di neurotrasmettitori eccitatori, la riduzione dell'infiammazione, la riduzione della produzione di radicali liberi, la riduzione della permeabilità vascolare e della barriera emato-encefalica e quindi della formazione di edema. Dal punto di vista cardiologico, invece, ad effetti benefici corrispondono anche effetti potenzialmente deleteri. Diversi studi hanno confermato il ruolo cardioprotettivo dell'ipotermia mediante la riduzione del metabolismo basale, riducendo la produzione di ROS, il danno mitocondriale, il danno della membrana e la disfunzione delle pompe ioniche. È ancora discusso il ruolo dell'ipotermia nella riduzione dell'area infartuata ma sembra che questo ruolo protettivo sia effettivamente presente. Inoltre, non si devono sottovalutare tutti quegli eventi fisiologicamente correlati ad uno stato ipotermico che possono però rappresentare veri e propri effetti avversi e quindi un pericolo e un danno al paziente come il brivido, l'aumento del tempo di coagulazione, l'immunosoppressione, il rischio di infezione soprattutto polmonare, l'interazione con il metabolismo dei farmaci, l'iperglicemia e le disionemie.

Oltre a questi effetti negativi, sussistono una serie di problemi tecnici nell'utilizzo dell'ipotermia terapeutica e di costi per cui l'utilizzo routinario dell'ipotermia dopo arresto cardiaco rimane basso e limitato a centri di alto livello. Esiste poi il problema delle tempistiche di induzione: si calcola che attualmente tra l'arresto cardiaco e il raggiungimento della temperatura target trascorrono delle ore²²⁶ e ad ogni ora di ritardo corrisponde il 30% circa di probabilità in meno di un outcome neurologico favorevole.²²⁷ Ecco quindi la necessità di identificare una via terapeutica che sfrutti gli effetti benefici dell'ipotermia migliorandone e ampliandone l'utilizzo. La ricerca attuale è quindi rivolta alla sperimentazione di nuove metodiche e in particolare di nuovi farmaci che mimando le stesse vie o inducendo

centralmente l'ipotermia, non solo permetterebbero un miglior controllo, praticità e rapidità nell'induzione terapeutica dell'ipotermia ma preserverebbero anche il cuore dai potenziali effetti avversi.

Questo studio sperimentale si è posto l'obiettivo di valutare l'azione di un farmaco agonista dei cannabinoidi WIN 55.212-2 che induce un'ipotermia moderata agendo centralmente a livello ipotalamico⁸⁰. Si è preso in considerazione proprio questo farmaco in quanto riteniamo che abbia tutte le caratteristiche per essere applicato nella pratica clinica. Dal punto di vista farmacocinetico e farmacodinamico presenta una cinetica rapida e progressiva con una breve emivita media di distribuzione (0.12 h) e una lunga emivita di eliminazione (4.93 h).²²⁸ Presenta poi oltre ad un effetto ipotermico⁷⁶ anche un concomitante effetto sedativo e analgesico, auspicabili nel tipo di paziente che si andrebbe a trattare. Avendo un meccanismo d'azione noto di tipo recettore mediato sarebbe anche possibile la sintesi di un farmaco antagonista che ne andrebbe a rendere reversibili in tempi più o meno lunghi l'effetto. Si consideri, infine, la praticità e l'utilità che avrebbe un farmaco di questo tipo se dato in emergenza subito dopo l'inizio del periodo di ischemia.

Oltre alla sperimentazione farmacologica si è deciso di sfruttare un modello sperimentale di arresto cardiaco che prevedesse anche un supporto cardiocircolatorio, quale la circolazione extracorporea, durante tutto il trattamento farmacologico. Questo è di rilevanza clinica poiché tale tipo di supporto viene attualmente preso in considerazione in pazienti vittime di uno shock cardiogeno o di un arresto cardiaco. Il dispositivo di assistenza ECMO ha, infatti, la capacità di provvedere ad un efficace supporto cardiocircolatorio nel breve termine grazie ad un sistema di bypass cardiopolmonare percutaneo. L'obiettivo al quale si sta puntando è quindi quello di offrire a questi pazienti sia un supporto emodinamico ad un cuore debilitato, o comunque in difficoltà, sia un trattamento vero e proprio in grado di prevenire gli effetti deleteri dell'ischemia cerebrale e cardiaca grazie all'utilizzo dell'ipotermia. Un modello animale così costituito è già stato testato dal nostro gruppo di ricerca, ma all'epoca non era stata ancora presa in considerazione la possibilità di analizzare i cervelli e quindi ci si è limitati ad osservare gli effetti neuroprotettivi.²²⁹

Lo scopo dello studio è di valutare i benefici e l'eventuale superiorità, dell'ipotermia indotta farmacologicamente rispetto all'ipotermia terapeutica e alla normotermia. Si è quindi eseguito uno studio biomolecolare su biopsie autoptiche del cervello, mettendo in relazione i risultati ottenuti dal gruppo trattato farmacologicamente (PH) con quelli ottenuti dal gruppo in condizioni di normotermia (NT) e dal gruppo trattato con ipotermia terapeutica attiva (HT).

Premettendo che per tutti i parametri analizzati l'ipotermia terapeutica si è dimostrata significativamente protettiva nei confronti dell'infiammazione, WIN 55.212-2 ha dato risultati paragonabili all'ipotermia convenzionale nell'espressione di IL 10 mRNA, IL 6 mRNA e MCP-1 mRNA. WIN 55.212-2 si è dimostrato invece meno efficace dell'ipotermia moderata attiva nell'indurre l'espressione di RBM 3 mRNA ma più efficace nel ridurre l'espressione di iNOS mRNA. Si può affermare, quindi, che l'ipotermia farmacologica offra una neuroprotezione in modo paragonabile all'ipotermia convenzionale per via topica.

4.5 CONCLUSIONI

In conclusione, si può affermare che, in base a questo studio, l'ipotermia indotta farmacologicamente con WIN 55.212-2 conserva i vantaggi neuroprotettivi dell'ipotermia topica tuttavia offre un vantaggio notevole nella pratica clinica per l'immediata disponibilità del farmaco e quindi iniziando immediatamente dopo l'arresto cardiaco la terapia.

Da valutare l'effetto combinato dell'ipotermia farmacologica e dell'ipotermia topica; ipotermia farmacologica applicata precocemente e seguita da un'ipotermia topica per raggiungere e mantenere la temperatura target.

5 ADENOSINA-LIDOCAINA-MAGNESIO (ALM)

5.1 SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio è dimostrare come attraverso la somministrazione sistemica di soluzione polarizzante ALM (Adenosina, Lidocaina e Magnesio) si possano ottenere effetti neuroprotettivi, dopo aver indotto un arresto cardio-circolatorio.

I numerosi esperimenti attuati fino a questo momento hanno portato evidenze favorevoli nell'uso dell'ALM sia come soluzione cardioplegica, alternativa alla cardioplegia iperkaliemica, sia come soluzione cardioprotettiva. Su questo aspetto, però, gli studi sono ancora in corso per approfondirne gli effetti.

Inoltre, cominciano a riscontrarsi evidenze positive sulla protezione anche di altri organi e apparati a seguito di un arresto cardio-circolatorio.

A seguito di un intervento cardiocirurgico, infatti, sono importanti le complicanze che possono insorgere nel decorso post-operatorio, soprattutto a livello cerebrale.

Scopo dell'esperimento è di riuscire ad identificare l'effettivo ruolo dell'impiego di ALM come aiuto terapeutico nel migliorare e preservare la funzionalità cerebrale a seguito di un arresto cardiaco accidentale sottoposto ad ECLS.

5.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO

Al momento dell'arresto cardiaco i ratti sono stati randomizzati in tre gruppi:

ACC: è stata iniettata soluzione fisiologica (0,9% NaCl). (n = 10)

ACH: ratto è stato raffreddato a 32°C per 1 ora ed iniettata soluzione fisiologica 1 ml (n = 10)

ACALM: è stata infusa la soluzione ALM per via endovenosa. (n = 10)

Nello studio, il gruppo dei ratti trattati con ALM ha ricevuto il trattamento farmacologico attraverso un'iniezione in bolo endovenoso lento di 1 ml di soluzione contenente ALM diluita in 20 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%). La soluzione utilizzata presentava la seguente composizione: Adenosina 1mM, Lidocaina cloridrato 3 mM, Magnesio solfato 2,5 mM. Dopo 60 minuti di ri-perfusione tramite CPB il ratto viene svezzato da CPB e poi dopo l'analisi emodinamica sacrificato e i tessuti cardiaci e cerebrali vengono prelevati e conservati per le analisi.

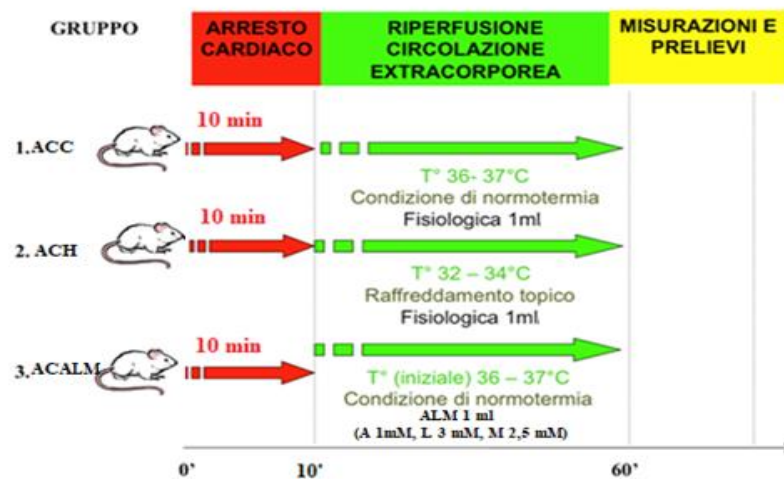


Figura 26: Protocollo sperimentale. ACC=controllo normotermia; ACH = gruppo trattato con ipotermia terapeutica; ACALM = gruppo trattato con infusione di ALM.

5.3 RISULTATI

BIOLOGIA MOLECOLARE

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata con Kruskal-Wallis/Dunn's Multiple Comparison Post hoc Test ed i valori sono significativi per $p < 0.05$ (*).

RBM-3 mRNA (RNA binding protein-3)

RBM-3 è una proteina di legame, la sua espressione è stimolata da fattori esterni come ipossia ed ipotermia ed esprime un'importante funzione anti-apoptotica, quindi neuro-protettiva.

Valutando i livelli di RBM-3 mRNA nei tre gruppi, si riscontra come l'aumento di espressione del gene sia altamente significativo ($p < 0.05$) nel gruppo trattato con ALM, rispetto al gruppo di controllo trattato con soluzione fisiologica ed è aumentato anche rispetto al gruppo trattato con ipotermia terapeutica. (Figura 27)

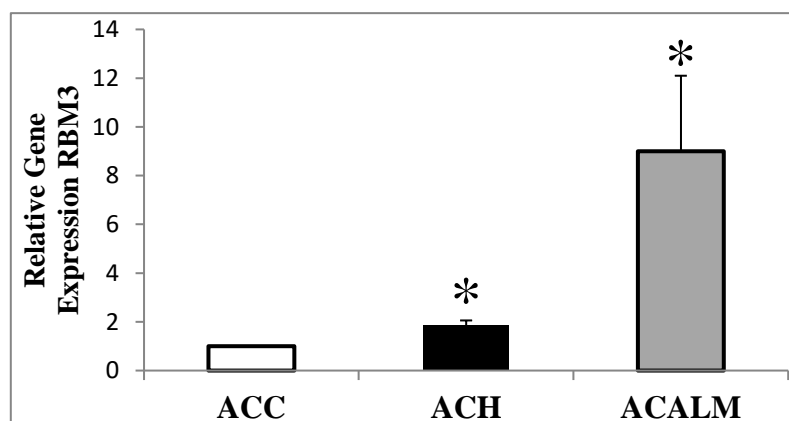


Figura 27: Valutazione del grado di espressione di RBM-3 mRNA nei reperti biotipici cerebrali dei tre gruppi trattati. ACC=controllo normotermia; ACH=gruppo trattato con ipotermia terapeutica; ACALM= gruppo trattato con infusione di ALM.

IL-10 mRNA

IL-10 è un'importante interleuchina antinfiammatoria prodotta principalmente da monociti e dai linfociti T. Essa è in grado di inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie, quali IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α e possiede un ruolo modulante l'infiammazione.

I risultati ottenuti mostrano come nel gruppo trattato con ALM ci sia un aumento significativo dei livelli di IL-10 ($p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo. (Figura 28)

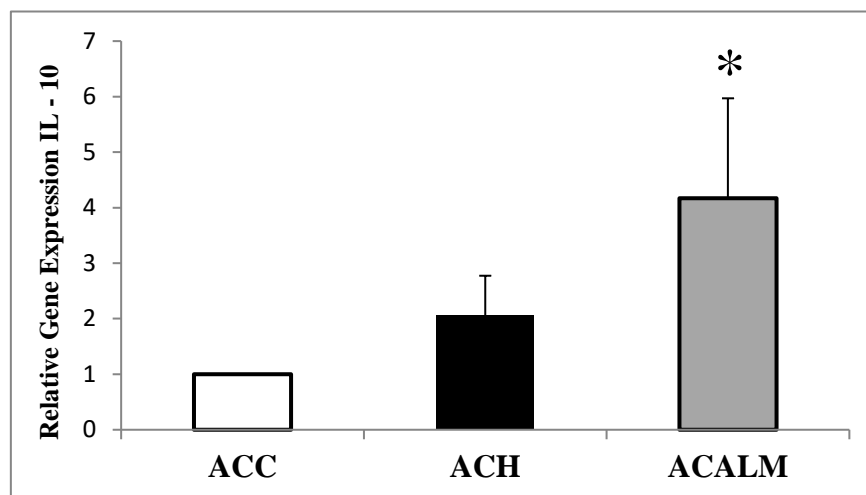


Figura 28: Valutazione del grado di espressione di IL-10 mRNA nei reperti biotipici cerebrali dei tre gruppi trattati. ACC=controllo normotermia; ACH=gruppo trattato con ipotermia terapeutica; ACALM=gruppo trattato con infusione di ALM.

IL-6 mRNA

IL-6 è una citochina con attività pro-infiammatoria e, in parte, anche antinfiammatoria. Dal punto di vista cerebrale è particolarmente importante nel mediare il danno infiammatorio, in quanto è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, inducendo a livello ipotalamico la febbre e la sintesi di altri mediatori coinvolti nell'infiammazione.

I risultati dell'analisi biomolecolare evidenziano livelli di IL-6 mRNA complessivamente aumentati nel gruppo trattato con ALM con una differenza rispetto al gruppo di controllo che risulta significativa nonostante l'ampia variabilità dei valori risultati nel gruppo ALM. Inoltre è da notare la notevole differenza con il gruppo trattato con ipotermia terapeutica in cui l'espressione di IL-6 mRNA risulta ridotto non solo rispetto al gruppo trattato con ALM ma anche rispetto al gruppo di controllo, evidenziando quindi come l'ipotermia riduca la risposta e l'attivazione dell'infiammazione. (Figura 29)

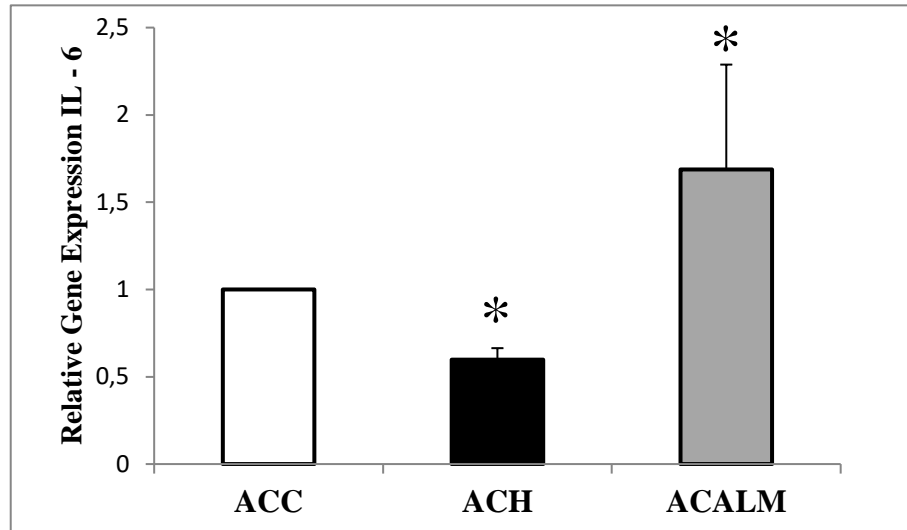


Figura 29: Valutazione del grado di espressione di IL-6 mRNA nei reperti biotici cerebrali dei tre gruppi trattati. ACC=controllo normotermia; ACH=gruppo trattato con ipotermia terapeutica; ACALM=gruppo trattato con infusione di ALM.

MCP-1 mRNA (monocyte chemotactic protein-1)

MCP-1 appartiene alla famiglia delle chemochine ed è deputata al reclutamento di monociti, linfociti T e cellule dendritiche, nei siti di infezione ed infiammazione. Questo indice pro-infiammatorio risulta avere livelli di espressione simili tra il gruppo trattato ed il gruppo di controllo e il gruppo con ipotermia terapeutica ($p > 0.05$). (Figura 30)

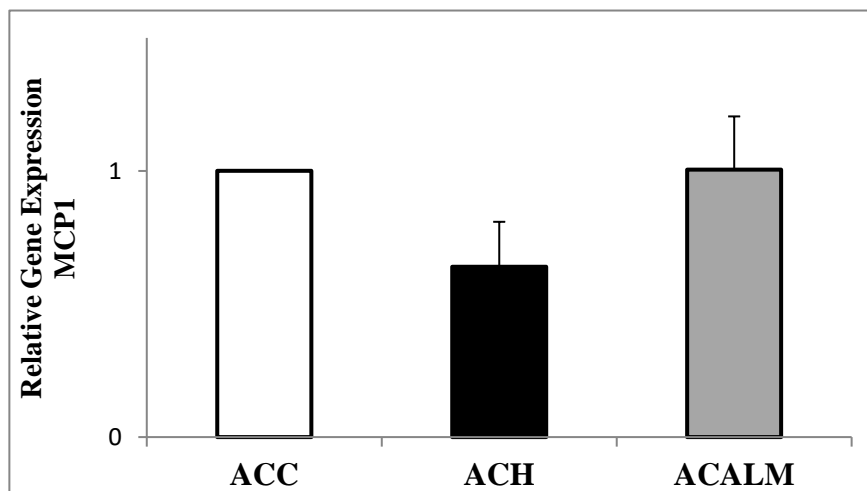


Figura 30: Valutazione del grado di espressione di MCP1 mRNA nei reperti biotici cerebrali dei tre gruppi trattati. ACC=controllo normotermia; ACH=gruppo trattato con ipotermia terapeutica; ACALM=gruppo trattato con infusione di ALM.

iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)

iNOS è una forma di Ossido Nitrico Sintasi inducibile, che viene attivata da un evento ischemico e porta alla produzione di NO in eccesso. Questo può reagire con specie reattive dell'ossigeno e stimolare la risposta infiammatoria, fondamentali meccanismi per lo sviluppo del danno da ischemia-riperfusione.

Nonostante quello che si potrebbe intuire visivamente dal grafico sottostante, i livelli di espressione di iNOS risultano essere simili tra i due gruppi data l'ampia variabilità riscontrata tra i campioni trattati con ALM e i campioni di controllo, nel gruppo trattato con ipotermia la produzione di NO da parte di iNOS risulta invece ridotta. (Figura 31)

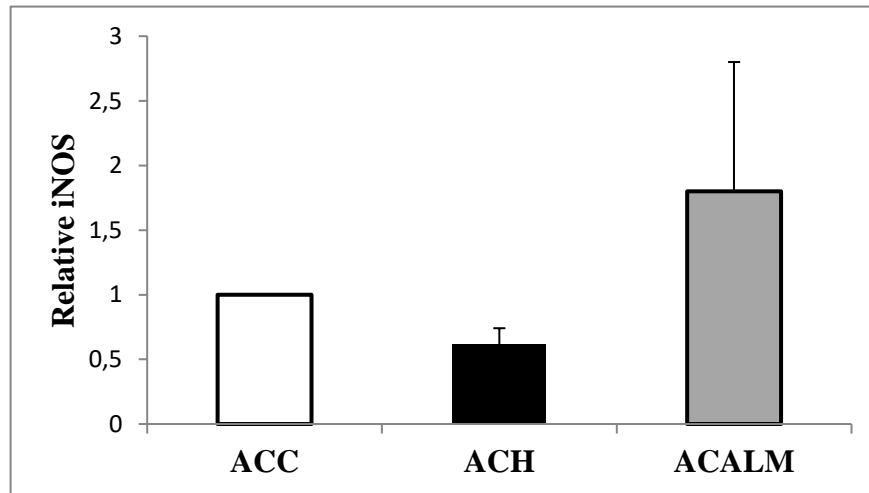


Figura 31: Valutazione del grado di espressione di iNOS mRNA nei reperti biotici cerebrali dei tre gruppi trattati. ACC=controllo normotermia; ACH=gruppo trattato con ipotermia terapeutica; ACALM=gruppo trattato con infusione di ALM.

ISTOLOGIA

Dopo il primo esperimento sull'ipotermia terapeutica in ambito di neuroprotezione è stato chiaro che oltre alle indagini di biologia molecolare era necessario ottenere anche delle immagini significative che prima di tutto identificassero il danno cerebrale causato da 10 minuti di ischemia e poi che potessero evidenziare le differenze tra i trattamenti utilizzati. Ottenere dei risultati in questo senso non è stato facile; un primo risultato è stato ottenuto con la sola colorazione con ematossilina-eosina. Il confronto visivo di fette corrispondenti ha potuto evidenziare la presenza di neuroni dall'aspetto degenerativo con la presenza di nucleo picnotico e ipereosinofilia del citoplasma (neuroni rossi) presente in tutti i gruppi analizzati. In particolare, una maggior presenza di segni di ischemia cerebrale è stata osservata nel gruppo di controllo con arresto cardiaco normotermico. Inoltre, confrontando il gruppo con arresto cardiaco ipotermico ed il gruppo con arresto cardiaco trattato con ALM non sono state riscontrate differenze significative conferendo quindi ai due trattamenti una simile efficacia neuroprotettiva.

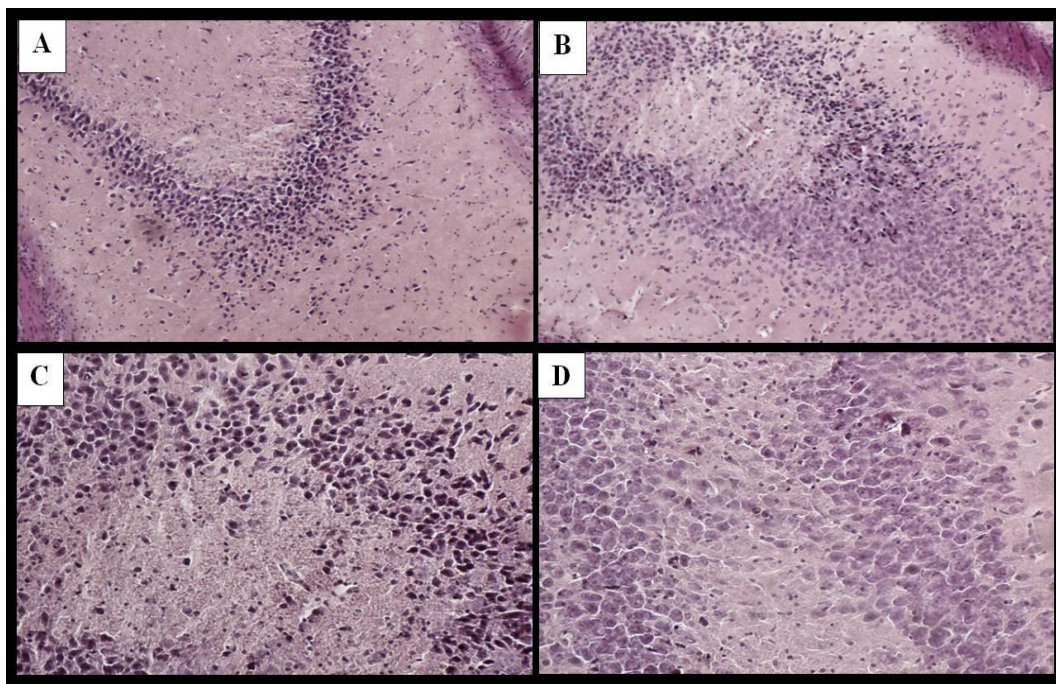


Figura 32: Immagini istologiche con colorazione ematossilina eosina. Tutte mostrano la presenza di un danno neuronale con degenerazione cellulare. A-B) cervello di ratto che ha subito arresto circolatorio normotermico; C) arresto circolatorio ipotermico D) arresto circolatorio con perfusione di ALM.

5.54 DISCUSSIONE

L'arresto cardio-circolatorio costituisce una condizione che può essere accidentale, se si verifica improvvisamente sul territorio, oppure controllata se viene indotta in sala operatoria per consentire l'esecuzione di un intervento cardiocirurgico.

Nel primo caso, da tempo si cerca di identificare l'approccio più idoneo ed efficace nel trattamento e nella prevenzione dell'arresto cardiaco e dei suoi esiti. Con questo obiettivo sono nati concetti quali la catena della sopravvivenza o la defibrillazione precoce, e per questo si cerca continuamente di sensibilizzare la popolazione sull'argomento, istruirla nell'esecuzione delle manovre di rianimazione cardiopolmonare e sull'utilizzo di semplici macchinari salvavita (es defibrillatore automatico).

Nel secondo caso, invece, sono in corso continui studi per cercare nuove possibilità terapeutiche che possano migliorare la funzionalità cardiaca dopo arresto cardiaco cardioplegico e preservare la funzionalità cerebrale dopo un arresto di circolo indotto in corso di un intervento cardiocirurgico sull'arco aortico.

Tra queste possibilità l'ALM riveste un ruolo importante, e non solo a livello sperimentale. Si stanno concretizzando, infatti, anche impieghi in ambito clinico, che stanno cominciando a dare risultati positivi in ambito cardiocirurgico.

Studi clinici condotti presso l'Università di Verona^{183,184} hanno dimostrato come l'ALM (con l'aggiunta anche di insulina), utilizzata con intento cardioplegico, possa:

- ridurre il rilascio di troponina nel periodo post-operatorio e contenere il rialzo dei lattati,
- migliorare la funzionalità cardiaca post-operatoria,
- facilitare la ripresa cardiaca nella fase post-cardioplegia,
- diminuire l'utilizzo di alte dosi di agenti inotropi,
- diminuire la trasfusione di sangue ed emoderivati nel periodo post-operatorio,
- diminuire il periodo di degenza in ospedale rispetto all'utilizzo della cardioplegia Buckberg.

La formulazione e l'utilizzo dell'ALM è stata dapprima sperimentata da Dobson su diversi modelli animali, dando risultati soddisfacenti nel tentare di sostituire l'ampio utilizzo di soluzioni cardioplegiche ad alto contenuto di potassio, che comportano tutta una serie di possibili complicanze post-chirurgiche da non sottovalutare.

I meccanismi antinfiammatori che vengono promossi dall'ALM sono dovuti principalmente al contributo di adenosina e lidocaina. L'adenosina, in tal senso favorisce una minor espressione/attivazione di selectine/integrine sui neutrofili, inibizione dell'espressione di

molecole di adesione, diminuzione dell'attivazione linfocitaria e della migrazione tissutale. La lidocaina, invece, diminuisce l'attivazione dei neutrofili, la liberazione del TNF-alfa e la proliferazione T cellulare.

Sul versante coagulativo l'ALM determina un minor grado di aggregazione piastrinica e di espressione del fattore tissutale. Effetti non trascurabili, dal momento che potrebbero comportare una riduzione delle complicanze post-operatorie. In alcuni modelli animali, inoltre, la somministrazione di ALM, dopo l'induzione di shock emorragico, favorisce il ripristino di valori di PT e aPTT più vicini a quelli basali, rispetto all'utilizzo di altre soluzioni nei gruppi di controllo.²³⁰

L'ALM, quindi, può avere svariati potenziali impieghi, che vanno oltre l'uso alternativo alle soluzioni cardioplegiche iperkaliemiche.

In questo studio, perciò, non si è voluto studiare l'effetto cardioplegico dell'ALM, ma piuttosto gli effetti neuro-protettivi dovuti ad una somministrazione per via sistemica, attraverso bolo endovenoso, in seguito ad arresto cardiaco con supporto circolatorio extracorporeo. Oltre alla sperimentazione farmacologica si è deciso quindi di sfruttare un modello sperimentale di arresto cardiaco che prevedesse anche un supporto con CPB durante il periodo di riperfusione. Questo è di rilevanza clinica poiché tale tipo di supporto viene attualmente preso in considerazione in pazienti vittime di uno shock cardiogeno o di un arresto cardiaco. Il dispositivo di assistenza ECMO ha, infatti, la capacità di provvedere ad un efficace supporto cardiocircolatorio nel breve termine grazie ad un sistema di bypass cardiopolmonare percutaneo. L'obiettivo al quale si sta puntando è quindi quello di offrire a questi pazienti sia un supporto emodinamico ad un cuore debilitato, o comunque in difficoltà, sia un trattamento vero e proprio in grado di prevenire gli effetti deleteri dell'ischemia cerebrale e cardiaca grazie all'utilizzo di ALM.

L'aspetto neuro-protettivo è stato valutato ricercando segni di attivazione pro-infiammatoria, prendendo in considerazione IL-6 mRNA, MCP-1 mRNA e iNOS mRNA, ma anche segni di attivazione delle vie antinfiammatorie analizzando IL-10 mRNA e RBM-3 mRNA.

L'aumento del trascritto di IL-10, 4 volte superiore rispetto ai valori del gruppo di controllo normotermico e significativo con $p < 0,05$ evidenzia le proprietà antinfiammatorie di ALM. Anche l'ipotermia determina un aumento del trascritto, ma questo non risulta significativo. L'aumento di IL-10 non è in effetti un risultato disatteso poiché la letteratura, per ciascuna delle sue componenti, evidenzia la capacità di stimolare la secrezione di questa citochina antinfiammatoria.^{231,232,233}

RBM-3 risulta aumentata in maniera significativa sia nel gruppo ACALM che nel gruppo ACH. L'aumento nel gruppo trattato con ALM risulta 4 volte maggiore rispetto a quello riscontrato nel gruppo trattato con ipotermia. Tale notevole aumento appare quindi ancora più significativo in considerazione del fatto che l'ipotermia è uno dei fattori stimolanti l'espressione di RBM-3.

Il trascritto di IL-6 appare invece aumentato nel gruppo ACALM mentre è ridotto nel gruppo ACH. IL-6 è una citochina i cui effetti sono complessivamente molto variabili per cui risulta difficoltoso attribuire un significato certo all'aumento riscontrato. Questa citochina infatti possiede un ruolo che può essere sia pro-infiammatorio sia antinfiammatorio; l'effetto complessivo infatti dipende dal contesto citochinico e dagli stimoli che ne determinano la produzione. L'aumento riscontrato della produzione di IL-10 con il consensuale aumento di IL-6 e l'assente aumento delle altre citochine pro-infiammatorie studiate potrebbe significare che in questo contesto IL-6 abbia un effetto antinfiammatorio.

Le misurazioni dei trascritti di iNOS e di MCP-1 non sono invece risultate significative forse la loro espressione non è influenzata da ALM.

ALM ha quindi mostrato di dare espressione aumentata di geni ad attività anti-infiammatoria (soprattutto RBM-3 mRNA e IL-10 mRNA), rispetto a quelli pro-infiammatori, nonostante si sia rilevata qualche discrepanza per l'aumento di livelli di IL-6 mRNA nel gruppo trattato con ALM rispetto al gruppo di controllo.

Inoltre, anche il reperto istologico sembra confermare un ruolo protettivo di ALM; ad un confronto visivo dei vetrini è infatti più evidente la presenza di danno ischemico nei ratti non trattati. Tuttavia, la sola colorazione ematossilina eosina non fornisce molte informazioni e sono quindi necessari metodi più efficaci integrando istologia ad immunoistochimica o immunofluorescenza.

Si può affermare, quindi, che l'ALM è in grado di conferire al tessuto cerebrale un certo livello di protezione cerebrale, anche se alcuni aspetti meriterebbero un ulteriore approfondimento.

5.5 CONCLUSIONI

Alla luce dei dati riscontrati, l'infusione di ALM post-arresto cardiocircolatorio sembra esercitare un ruolo protettivo nel danno da ischemia-riperfusionazione sul tessuto cerebrale.

Le analisi di biologia molecolare effettuate sul tessuto cerebrale, prelevato al termine del periodo di riperfusionazione, hanno mostrato un'espressione aumentata di geni ad attività antinfiammatoria rispetto a quelli pro-infiammatori, mostrando così complessivamente un effetto neuro-protettivo dell'ALM.

L'impiego dell'ALM post-arresto cardiaco potrebbe quindi essere di supporto a tutti quei pazienti che subiscono le conseguenze del danno ipossico-ischemico e che manifestano la cosiddetta sindrome post arresto cardiaco gravata da lesioni neurologiche di diverso grado.

Se efficace il farmaco potrebbe migliorare il decorso, accelerare la ripresa post arresto cardiaco e ridurre ospedalizzazione e comorbidità.

Se l'effetto di ALM si dimostrasse efficace in questo senso il farmaco potrebbe essere usato anche durante interventi che prevedano un arresto di circolo e potrebbe contenerne le complicanze post-operatorie, migliorarne il decorso in terapia intensiva e consentire una più facile ripresa post-intervento.

Altri studi saranno necessari per comprendere al meglio i possibili impieghi di ALM.

6 OSSIDO NITRICO (NO)

6.1 SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio propone l'utilizzo del gas medicale Ossido Nitrico (NO) attraverso ECLS (Extracorporeal Life Support) in uno scenario caratterizzato da arresto cardiaco seguito da rianimazione con circolazione extracorporea.

Si prefigge l'obiettivo di studiare l'efficacia neuroprotettiva e cardioprotettiva di NO nei fenomeni di danno da ischemia-riperfusion, approfondendo l'analisi sull'effetto antiinfiammatorio e anti-apoptotico già dimostrato da studi su farmaci NO donor. Si ritiene altamente probabile che la somministrazione di gas medicale NO all'interno dell'ossigenatore durante ECLS, possa portare a una riduzione del danno ipossico-ischemico cerebrale e a un miglioramento della funzionalità cardiaca post-arresto.

Affinché si raggiungano tali obiettivi, si richiede l'analisi e lo studio dei meccanismi molecolari dell'ischemia cerebrale e attivazione infiammatoria durante ECLS in assenza ed in presenza di protezione con NO.

Di conseguenza i risultati potrebbero suggerire la possibilità di un nuovo impiego del gas medicale NO in ambito medico, già disponibile in terapia intensiva e sala operatoria ma momentaneamente limitato al solo utilizzo per via inalatoria, nell'ipertensione polmonare acuta e nella disfunzione ventricolare destra post cardiectomia.

6.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO

Al momento dell'arresto cardiaco i ratti sono stati randomizzati in due gruppi:

ECLS: CPB condotto normalmente in normotermia per 1 ora (n = 15)

ECLS + NO: NO 20 ppm somministrati attraverso ossigenatore per 1 ora (n = 15)

Nei soggetti trattati con NO viene preparato anche l'erogatore INOblender con il suo rilevatore INOMAX. Per procedere a questa operazione si collega la linea di somministrazione di Ossigeno con FiO₂ al 90% e la bombola di Ossido Nitrico azionata a 20 ppm al miscelatore. Si collega il rilevatore di NO all'ossigenatore del circuito ECLS dove viene anche collegata l'estremità che insuffla la miscela di Gas (O₂+NO) proveniente dall'INOblender. Per i restanti soggetti (il gruppo controllo non trattato con NO) questa

procedura non viene effettuata; la linea di erogazione d'ossigeno viene collegata direttamente all'ossigenatore. Dopo 60 minuti di ri-perfusione tramite CPB il ratto viene svezzato da CPB e poi dopo l'analisi emodinamica sacrificato e i tessuti cardiaci e cerebrali vengono prelevati e conservati per le analisi.

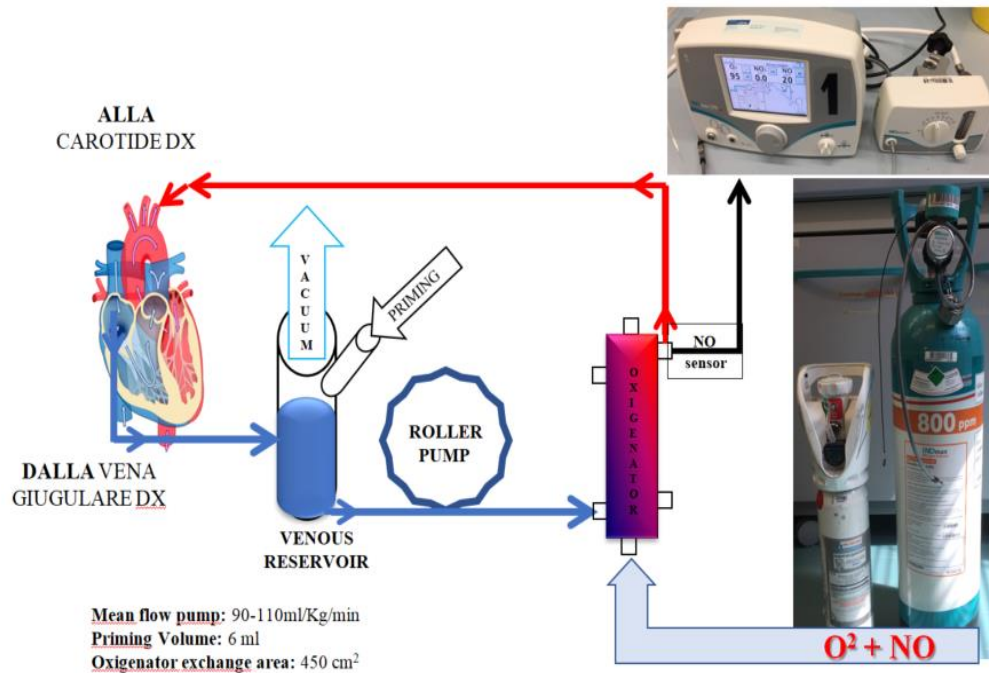


Figura 33: Schema del circuito CPB collegato all'erogatore iNOMax, ne gruppo di ratti trattati con NO sono somministrati 20 ppm durante il periodo di ri-perfusione (60 minuti).

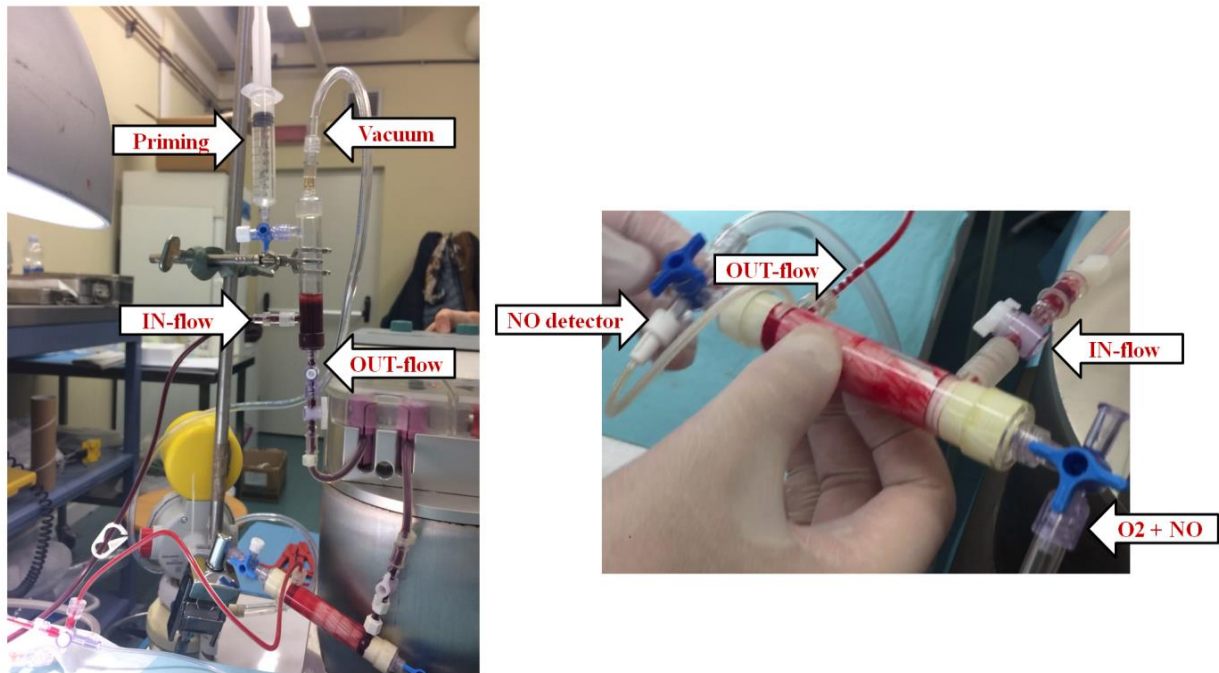


Figura 34: dettagli del circuito CPB: in particolare vengono mostrati i collegamenti del circuito iNOMax all'ossigenatore.

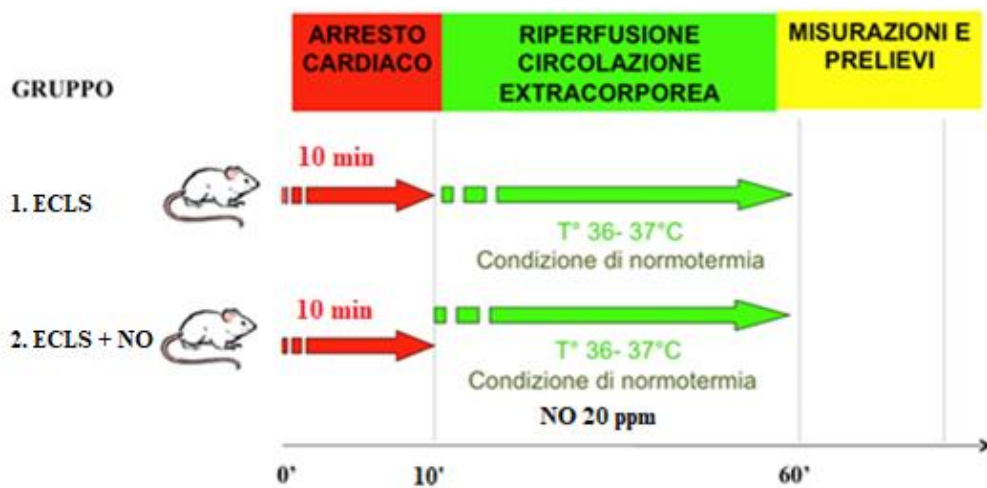


Figura 35: protocollo sperimentale di trattamento.

ECLS = controllo, ECLS + NO = somministrazione di NO 20 ppm attraverso ossigenatore.

6.3 RISULTATI

EMOGASANALISI

	GRUPPO DI CONTROLLO			GRUPPO TRATTATO CON OSSIDO NITRICO		
	EGA 1	EGA 2	EGA 3	EGA 1	EGA 2	EGA 3
pH	7,04±0,2	7,28±0,03	7,35±0,07	7,26±0,2	7,38±0,02	7,33±0,01
pCO₂ (mmHg)	101±5,5	31±5,3	39±3,5	95±5,2	24±4,3	36±3,2
pO₂ (mmHg)	12,1±3,1	448,4±50	259,8±55	11,6±3,5	432±43	238,7±55
Hct (%)	46,1±2,5	27,6±3,3	29,5±4,1	44±2,1	29,7±2,8	30,7±4,3
Glu (mg/dL)	244,7±50	454,9±45	442,7±72	325,17±30	453,17±53	431,7±65
Lat (mmol/L)	9,07±2,2	10,58±2,7	7,23±1,8	7,81±2,2	9,63±2,4	6,45±1,6

Tabella VII: Media dei valori di Emogas Analisi dei soggetti di controllo e trattati con NO, misurati all'inizio, a 30 e a 60 minuti dall'avvio del circuito ECLS.

Le Emogas Analisi sono state effettuate in tre momenti diversi durante la fase sperimentale: post arresto cardiaco (EGA1), a 30 minuti dall'avvio della circolazione extracorporea (EGA2) e al termine dell'assistenza (EGA3).

Sono stati evidenziati per entrambi i gruppi, controllo e trattati con NO, nella prima analisi una alterazione dei parametri tipica di una condizione ipossica, quali acidosi mista metabolica e respiratoria con aumento dei lattati, calo della pressione parziale di ossigeno pO₂ ed aumentata pressione parziale di anidride carbonica pCO₂. È evidente anche un aumento dei livelli di glucosio, dato dalla situazione di stress metabolico a cui sono sottoposti i soggetti.

Già a 30 minuti dall'inizio della circolazione extracorporea sono evidenti segni di miglioramento metabolico, con un recupero del valore di pH normale e un calo della pCO₂; condizione mantenuta stabile anche a termine dell'assistenza cardiorespiratoria. I valori della pO₂ sono piuttosto elevate a causa della concentrazione di O₂ somministrata all'interno dell'ossigenatore superiore rispetto alla concentrazione ambientale.

Si nota inoltre i livelli dei lattati leggermente in aumento nel secondo Ega, per poi calare nuovamente a fine esperimento. Segno di un adeguata perfusione durante supporto con circolazione extracorporea L'ematocrito risulta diminuito a causa dell'emolisi provocata dalla

pompa roller della circolazione extracorporea, e a causa dell'emodiluizione generata del prime costituito 50% da soluzione elettrolitica e 50% da soluzione colloide utilizzato per il debollaggio iniziale del circuito.

IMMUNOFLUORESCENZA

Iba 1

Allo scopo di valutare se la somministrazione di NO all'interno dell'ossigenatore durante ECLS possa avere un ruolo nella riduzione dello stato infiammatorio dopo un danno da ischemia-riperfusion, abbiamo eseguito un'analisi di immunofluorescenza e quantificazione a microscopio a fluorescenza. Per tale analisi abbiamo utilizzato il marker specifico per la microglia attivata *Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1* (Iba1). La microglia è costituita da macrofagi specializzati nel tessuto di tipo nervoso, determinanti della prima e principale linea di difesa immunitaria del sistema nervoso centrale. La positività a questo tipo di marker indica quindi un'attivazione infiammatoria delle suddette cellule, e la sua quantità è indicativa del grado di infiammazione tissutale.

Per la quantificazione dell'Iba1 sono stati considerati i campioni ottenuti e conservati inPFA. In particolare, sono stati analizzati due vetrini per campione contenente 4 fette ciascuno, considerando 4 aree diverse per ogni fetta del cervello.

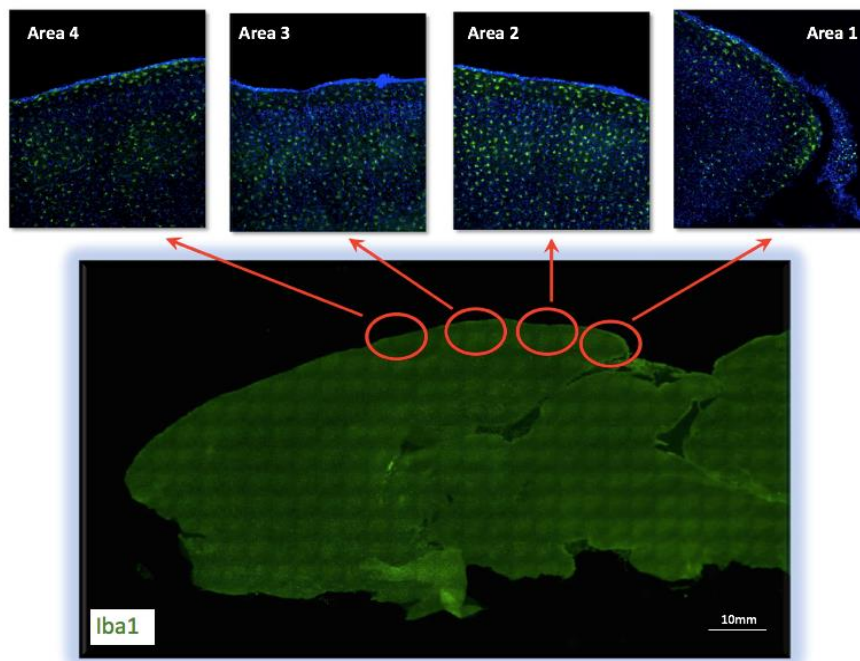


Figura36: Rappresentazione dell'Area 1,2,3,4 in corrispondenza della corteccia cerebrale, analizzate per la quantificazione dell'Iba1 (*Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1*).

Per ogni immagine ottenuta al microscopio viene delimitata la regione di interesse (ROI) calcolandone l'area. Si quantifica in seguito il numero di nuclei cellulari marcati con TO-PRO-3, che si presentano con colorazione blu fluorescente. Successivamente si determina la percentuale di marcatore anti-Iba1, che si presenta con colorazione verde fluorescente, presente singolarmente all'interno della ROI.

Si procede quindi ad effettuare una *colocalizzazione* tra nuclei e Iba1, ovvero si determina la proporzione di nuclei e Iba1 che si sovrappongono, ricavandone una percentuale.

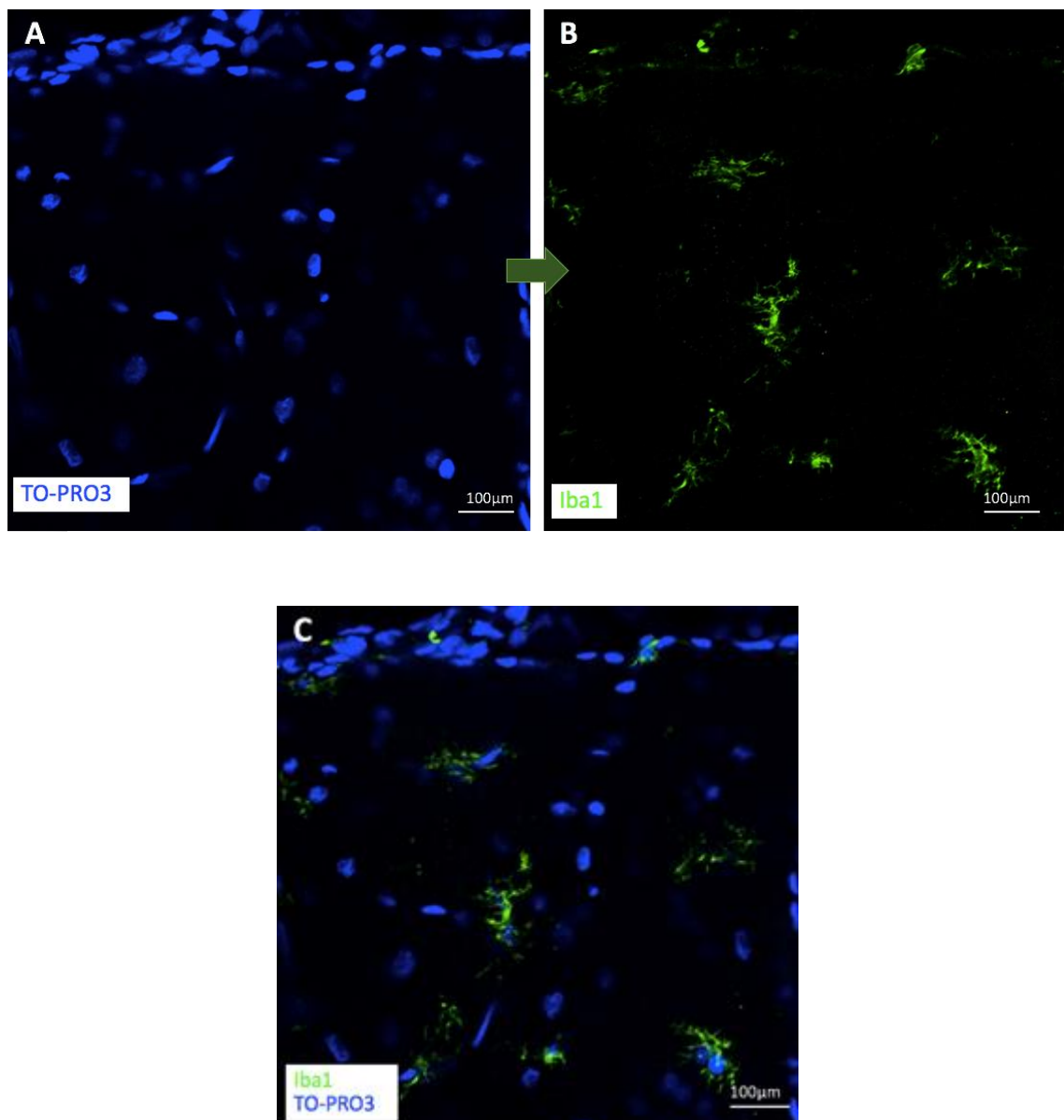


Figura 37: (A) Quantificazione nuclei cellulari marcati con TO-PRO3. (B) Quantificazione Iba1. (*Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1*) (C) Colocalizzazione Nuclei + Iba1.

I valori numerici dati da queste procedure nei campioni dei due gruppi vengono quindi processati ricavandone un grafico, il quale rappresenta con una raffigurazione matematica la differenza numerica presente tra i due gruppi. Come mostrato in figura 38, la percentuale di Iba1 positivo colocalizzato ai nuclei, per l'area totale della sezione, è maggiore nei ratti sottoposti a ECLS convenzionale ($12,58\% \pm 0,48\%$, $n = 3$) rispetto ai ratti sottoposti a ECLS con somministrazione di NO ($8,37\% \pm 0,41\%$, $n = 3$), le differenze tra le condizioni sperimentali sono state analizzate con t-test Unpaired e la differenza è statisticamente significativa con $p < 0,0001$. Tutte le analisi descritte sono state condotte con il software Graphpad (GraphPad Prism Versione 7, GraphPad Inc. La Jolla, CA).

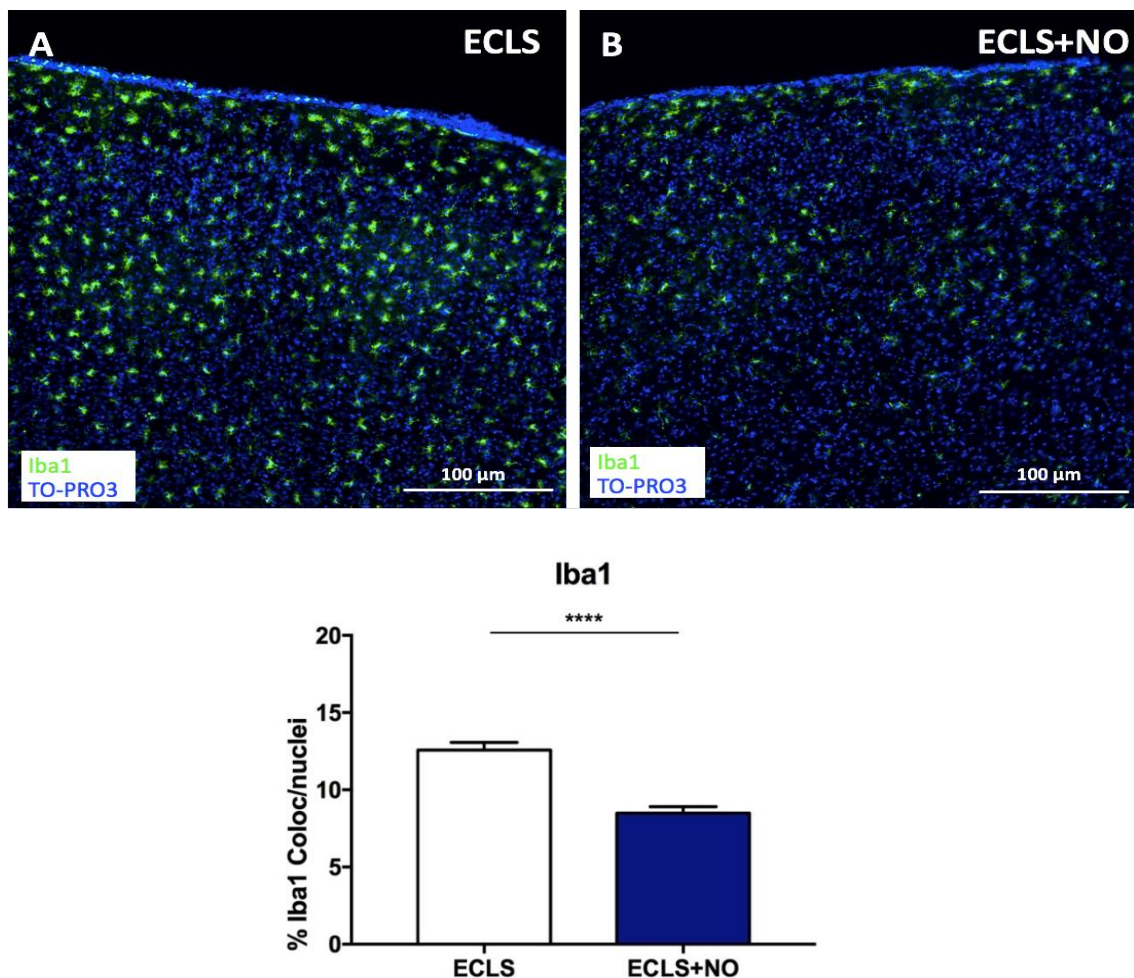


Figura 38: I soggetti sottoposti a circolazione extracorporea ECLS mediante somministrazione di Ossido Nitrico presentano una concentrazione del marcatore Iba1 minore rispetto ai soggetti del gruppo controllo. (A-B) Aree di fette sagittali del cervello immunocolorate con il marcatore neuronale specifico Iba1 (verde) e TO-PRO3TM (blu) nel controllo (A) e ratti trattati con NO (B). L'intera area colorata è stata considerata per la quantificazione. (C) Grafico rappresentativo della percentuale di cellule Iba1 positive nelle diverse aree cerebrali del gruppo di controllo - ECLS (bianco) e gruppo trattato - ECLS+NO (blu). **** $p < 0,0001$. Scale: 100 μm. I dati sono mostrati come media \pm SEM; 4 aree in 8 fette per ogni animale sono state analizzate per ciascun gruppo.

Tioli e Stress Ossidativo

Per valutare se la somministrazione di NO all'interno dell'ossigenatore durante ECLS può avere un ruolo nella riduzione nella formazione di ROS dopo un danno da ischemia-riperfusion, abbiamo eseguito anche in questo caso un'analisi di immunofluorescenza con quantificazione a microscopio a fluorescenza. Per tale analisi abbiamo utilizzato il marker specifico per l'ossidazione dei Tioli, 7-dietilammino-3-(4-maleimidilfen)-4-metil-cumarina (CPM). La quantificazione dei tioli è in relazione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS). La produzione naturale di un antiossidante, il glutathione (GSH), nelle cellule agisce come un meccanismo di difesa per contrastare gli effetti avversi dello stress ossidativo cellulare. Di conseguenza la quantificazione dei tioli possono essere utilizzati per rilevare i gruppi tiolici nel glutathione e monitorarne il tasso di produzione nelle cellule come risposta a livelli elevati di stress ossidativo da attività cellulari.

Per la quantificazione dei tioli ossidati sono stati considerati i campioni conservati in PFA e precedentemente perfusi con marker per tioli. In particolare, è stato analizzato un vetrino per campione contenente 4 fette ciascuno, considerando l'intera area della corteccia cerebrale, identificando la presenza dei tioli mediante la colorazione blu fluorescente determinata dalla sonda fluorescente CPM.

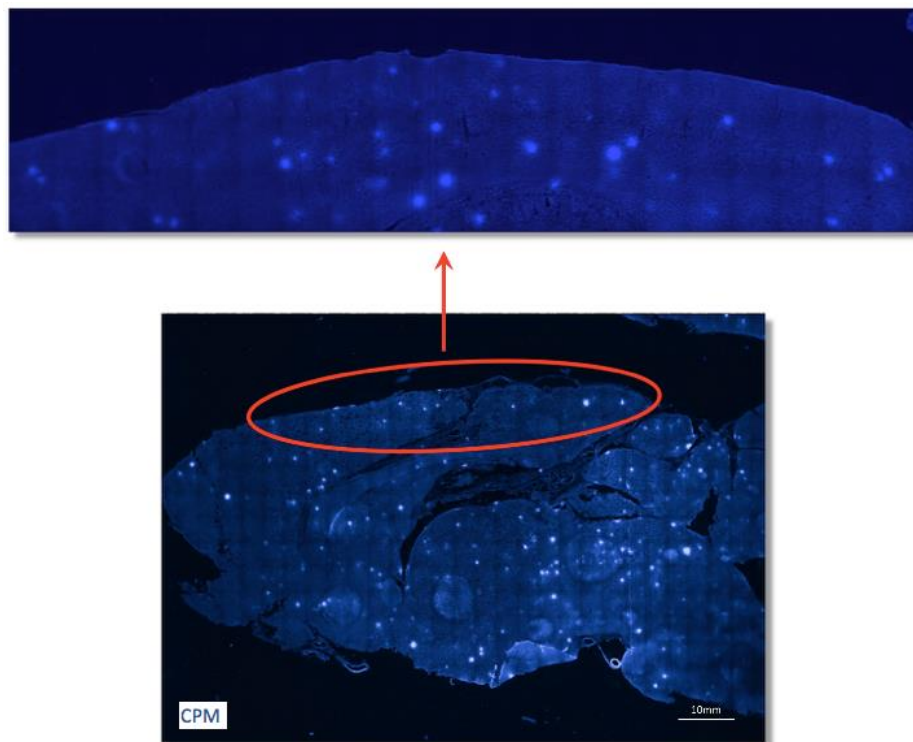


Figura 39: Rappresentazione dell'area in corrispondenza alla corteccia cerebrale analizzata per la quantificazione dei Tioli.

Per ogni immagine ottenuta al microscopio viene delimitata la regione di interesse (ROI) calcolandone l'area.

All'interno della ROI delimitata, viene impostata una soglia per valutare la percentuale del livello medio di grigio in ciascuna area (pixel positivi a una colorazione specifica nella regione considerata in confronto ai pixel dell'intera area della regione presa in considerazione). I valori medi per ciascun campione vengono quindi confrontati, ricavandone una rappresentazione grafica.

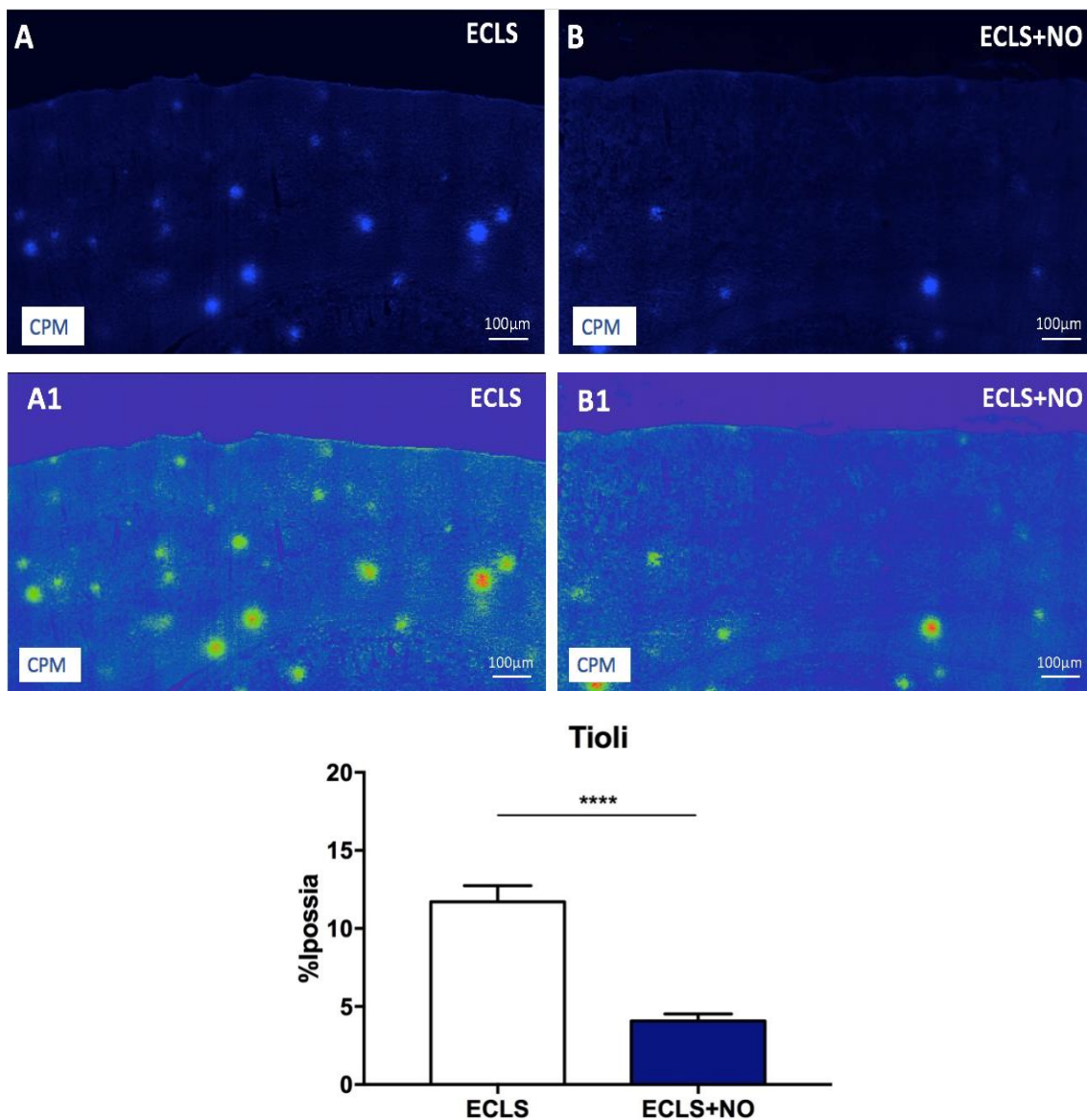


Figura 40: (A-B) Aree della corteccia cerebrale immunocolorate con la sonda fluorescente CPM nel controllo (A) e nei ratti trattati con NO (B). L'intera area colorata è stata considerata per la quantificazione. (A1-B1) Quantificazione formazione di tioli tramite scala colorimetrica, rappresentativa della massima intensità mediante il rosso (= massimo grado di ipossia), passando per il verde fino alla minima intensità mediante il blu (= assenza di ipossia). (C) Grafico rappresentativo della percentuale di Tioli ossidati positivi nelle aree cerebrali del gruppo di controllo - ECLS (bianco) e gruppo trattato - ECLS+NO (blu). ECLS = Extracorporeal Life Support. NO = Ossido Nitrico. I dati sono mostrati come media \pm SEM; 4 fette per ogni animale sono state analizzate per ciascun gruppo. Scale: 100m. CPM= 7-dietilammino-3-(4-maleimidilfen) -4-metil-cumarina.

Come mostrato in figura 40, la percentuale dello stato ossidativo, per l'area totale della sezione, è maggiore nei ratti sottoposti a ECLS convenzionale ($11,72\% \pm 1,03\%$, $n = 3$) rispetto ai ratti sottoposti a ECLS con somministrazione di NO ($4,07\% \pm 0,45\%$, $n = 3$), le differenze tra le condizioni sperimentali sono state analizzate con t-test Unpaired e la differenza è statisticamente significativa con $p < 0,0001$.

Tutte le analisi descritte sono state condotte con il software Graphpad (GraphPad Prism Versione 7, GraphPad Inc. La Jolla, CA).

6.4 DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, l'utilizzo di ECMO V-A per la rianimazione dell'arresto cardiaco refrattario a terapia medica si sta diffondendo sempre di più fino ad essere introdotta come fase aggiuntiva nella catena della sopravvivenza. Nonostante negli ultimi anni ci siano stati notevoli progressi nel campo medico, l'arresto cardiaco risulta essere ancora una delle principali cause di morte nei paesi industrializzati, rappresentando oltre il 50% di tutti gli eventi cardiovascolari fatali.

Il continuo aggiornamento delle risorse disponibili ha permesso un miglioramento dell'assistenza post AC; ciò nonostante, il tasso di mortalità dopo la dimissione ospedaliera si mantiene alto (40% dei casi di AC arriva vivo in ospedale dopo le convenzionali manovre rianimatorie, ma solo il 12% dei questi sopravvive a un mese dopo l'evento ischemico²³⁴).

Una delle cause principali alla base di questo dato è la sindrome post-arresto cardiaco che si va ad instaurare dopo l'evento. Questo processo fisiopatologico si verifica sia come conseguenza al danno ischemico, sia in seguito alla rianimazione e al danno da ischemia-riperfusion che si instaura.

La riperfusione data dal supporto ECMO, nonostante sia essenziale nel ridurre l'incidenza di eventi avversi dopo un arresto cardiaco, può a sua volta aggravare l'impatto dannoso. Durante la riperfusione, a causa del rilascio di molecole infiammatorie circolanti, dell'attivazione del complemento e dell'aumento della permeabilità endoteliale, si instaura la sindrome da risposta infiammatoria sistemica, accompagnata da uno stato di ipercoagulabilità. L'insieme di questi fattori contribuiscono all'occlusione microvascolare e all'instaurarsi del fenomeno di no-reflow, che contribuisce all'aggravarsi del danno cerebrale e della disfunzione miocardica già presenti.

La riossigenazione dei tessuti durante la riperfusione induce, inoltre, un'eccessiva formazione di radicali liberi, che contribuiscono ad aumentare la morte neuronale ossidando le proteine, danneggiando il DNA e inducendo la perossidazione lipidica.

La riduzione dello stress ossidativo, e quindi del danno ipossico, e la sottoregolazione della risposta infiammatoria sono opzioni di notevole considerazione come potenziali bersagli terapeutici al danno da ischemia-riperfusione. Di conseguenza gli agenti in grado di modulare gran parte di questi processi fisiopatologici possono costituire una soluzione terapeutica promettente. A tale proposito si evidenzia l'importante ruolo dell'ossido nitrico nella regolazione dell'infiammazione acuta, nella regolazione dell'apoptosi, nell'inibizione dell'adesione piastrinica, dell'aderenza e migrazione monocitaria e della generazione dei radicali liberi dell'ossigeno.

Grazie alla capacità nel modulare sia lo stress ossidativo che la risposta infiammatoria, molta attenzione è stata dunque focalizzata sul ruolo dei donatori di ossido nitrico (NOD) come agenti neuroprotettivi e cardioprotettivi nella fisiopatologia del danno da ischemia-riperfusione. Diversi modelli sperimentali hanno dimostrato la capacità dei NOD di modulare la dimensione della zona infartuata dopo ischemia cerebrale, se somministrato precocemente. Sono stati evidenziati effetti sulla modulazione della risposta infiammatoria; in particolare i NOD hanno dimostrato la loro capacità di inibire l'espressione delle molecole di adesione e l'infiltrazione delle cellule immunitarie vascolari, portando a una riduzione dell'espressione delle citochine proinfiammatorie nel sito di lesione, questo sia a livello cerebrale che a livello cardiaco.²²⁰

L'utilizzo di ECMO durante ECLS, può essa stessa indurre una risposta infiammatoria generalizzata innescando in parte un danno da ischemia-riperfusione, questo dovuto in particolare all'esposizione del sangue a superficie estranee che costituiscono i componenti del circuito ECMO. Tale risposta infiammatoria può contribuire alla disfunzione miocardica e alla riduzione della gittata cardiaca, determinando in ultima analisi la sindrome da bassa gittata cardiaca, la quale ritarda il recupero ed è associata a morbidità e mortalità significative. I ricercatori del Royal Children's Hospital di Melbourne hanno intrapreso un ampio studio prospettico randomizzato controllato, sulla somministrazione di ossido nitrico gassoso all'interno dell'ossigenatore del circuito della CEC, evidenziando un miglioramento in termini di riduzione della sindrome da bassa gittata cardiaca postoperatoria nel gruppo sottoposto alla somministrazione di NO.²¹⁴

Un ulteriore studio prospettico randomizzato, di dimensioni minore ma di medesima importanza, è stato intrapreso dai ricercatori del Texas Children's Hospital di Houston con la

medesima procedura (somministrazione di NO all'interno dell'ossigenatore durante CEC). Anche in questo caso sono stati evidenziati, nel gruppo trattato con NO, miglioramenti in termini di riduzione della durata di ventilazione e permanenza in terapia intensiva, e un miglioramento dello stato emodinamico.²¹³

Sulla base di queste nozioni, lo studio sperimentale da noi intrapreso propone anche egli l'utilizzo del gas medicale Ossido Nitrico somministrato all'interno del circuito ECMO, con l'obiettivo di studiare l'efficacia neuroprotettiva e cardioprotettiva di NO, nei fenomeni di danno da ischemia-riperfusion, approfondendo l'analisi sull'effetto antiinfiammatorio e anti-apoptotico già dimostrato da studi su farmaci NO donor.

Le due tecniche terapeutiche utilizzate sono già presenti nell'ambito rianimatorio: l'ECLS già utilizzato come "bridge to therapy" in arresti cardiaci refrattari alla terapia convenzionale, e l'Ossido Nitrico utilizzato ad oggi esclusivamente per via inalatoria come trattamento per l'ipertensione polmonare e disfunzione ventricolare destra. Di conseguenza i risultati ricavati dallo studio potrebbero suggerire la possibilità di un nuovo impiego del gas medicale NO in ambito medico.

Sono stati analizzati gli effetti a livello tissutale, soffermandosi sugli effetti neuroprotettivi, ricercando l'espressione proteica di determinati fattori coinvolti nei meccanismi infiammatorio ed ischemico.

Nello specifico sono stati analizzati campioni del tessuto cerebrale tramite immunofluorescenza, mediante la quantificazione del marker infiammatorio Iba1 e il marker per la riduzione dei Tioli nella valutazione dello stato ischemico. Dall'analisi si deduce come effettivamente la somministrazione di NO all'interno dell'ossigenatore, diminuisca lo stato infiammatorio e lo stato ischemico della corteccia cerebrale. Dai campioni infatti è risultato chiaro una netta riduzione dell'attivazione delle cellule della microglia evidenziando una riduzione dello stato di infiammazione del tessuto cerebrale. Ulteriore conferma del ruolo protettivo di NO deriva dai campioni su cui è stata eseguita la ricerca dei Tioli: i legami tiolici si formano in presenza di danno ossidativo. La formazione di radicali liberi dell'ossigeno è infatti un componente fondamentale del danno da ischemia-riperfusion; la presenza di un maggior numero di Tioli nel gruppo di controllo rispetto al gruppo trattato con NO evidenzia una notevole riduzione dello stress ossidativo nel gruppo sottoposto a trattamento.

Sulla base di questi risultati possiamo affermare che la sperimentazione risulta quindi di interesse scientifico e pone ottime basi future per un'effettiva neuroprotezione data dall'Ossido Nitrico, e quindi sul suo utilizzo durante procedure di assistenza cardiorespiratoria in seguito ad eventi ischemici post arresto cardiaco. L'impiego di NO

attraverso ECMO potrebbe inoltre essere utilizzato anche a scopo neuro protettivo anche nei casi di posizionamento ECMO post-intervento cardiocirurgico necessario per severa disfunzione cardiaca.

Ulteriori 10 campioni cerebrali che sono stati posti in azoto liquido sono ancora da analizzare, su questi verrà effettuato Western Blot alla ricerca di indici apoptotici (Caspase 3, Citocromo c) e indici di risposta infiammatoria (IL1, TNF α , IL 10). Da questi risultati ci aspettiamo una conferma di quanto rilevato con le indagini di immunofluorescenza.

Nel corso dello studio sono state apportate delle modifiche nell'applicazione della procedura, in particolar modo alla tecnica di cannulazione. Si è passati da un accesso centrale mediante sternotomia ad un accesso periferico mantenendo quindi il torace chiuso. Questo ha permesso un miglioramento emodinamico significativo nei soggetti, portando a una riduzione del sanguinamento, un miglior drenaggio da parte del circuito extracorporeo che ha consentito una miglior efficienza dell'assistenza. Si è determinato inoltre una minore necessità di riempimento volemico con soluzione fisiologica, comportando un ulteriore incremento dei valori di emoglobina ed ematocrito con conseguente aumento dell'apporto di ossigeno a livello tissutale. Questi benefici sono stati monitorati mediante Emogas Analisi che ha riportato un miglioramento di alcuni parametri emodinamici, quali pH, lattati, pCO₂, pO₂, senza però evidenziare differenze sostanziali tra i due gruppi.

Il nostro obiettivo per il futuro è quello di permettere la sopravvivenza del soggetto anche dopo l'assistenza circolatoria, in modo da poter eseguire analisi a 24 ore, in particolar modo analisi istologiche, risonanza magnetica e studi neurocomportamentali. I miglioramenti apportati tramite il nuovo modello a torace chiuso ci permette di essere fiduciosi nel raggiungimento di tale obiettivo.

Importante inoltre notare che i campioni analizzati sono stati sottoposti a un periodo di ischemia, (10 minuti di arresto cardiaco indotto) relativamente breve, ed il tempo concesso alla progressione dell'infiammazione (60 minuti di circolazione extracorporea) è stato minimo in quanto il ratto viene immediatamente sacrificato per l'analisi dei campioni. Il processo infiammatorio per svilupparsi completamente necessita di un periodo di tempo che va da alcune ore fino a giorni. Un modello sperimentale a 24 ore permetterebbe una maggiore sensibilità ai marker immunoistochimici, e quindi la possibilità di ricavare un indice di neuroprotezione più significativo.

6.5 CONCLUSIONI

Ad oggi lo studio sperimentale condotto ha riportato risultati positivi di notevole importanza, che permette di sostenere che l'impiego dell'Ossido Nitrico all'interno dell'ossigenatore durante ECLS può portare a miglioramenti a livello cerebrale.

Grazie all'analisi di immunoistochimica, si può affermare che la somministrazione di NO all'interno dell'ossigenatore determina una riduzione dello stato infiammatorio e dello stato ischemico a livello della corteccia cerebrale. Le analisi hanno riportato differenze statisticamente significative, con concentrazione minore dell'attivazione cellulare della microglia e quindi della risposta infiammatoria tissutale, e con una riduzione dei legami tiolici indice di una ridotta formazione di specie reattive dell'ossigeno e quindi minor stress ossidativo.

L'insieme dei dati raccolti ci dà una forte speranza e positività nel continuare la sperimentazione portandoci verso studi e analisi sempre più approfonditi; uno dei prossimi obiettivi è far sopravvivere il soggetto anche dopo l'assistenza circolatoria, in modo da poter eseguire analisi a 24 ore, tra cui analisi istologiche, risonanza magnetica e studi neurocomportamentali.

Tramite i dati ottenuti vogliamo suggerire la possibilità di un nuovo impiego del gas medicale NO in ambito medico: procedura che potrebbe per essere utilizzata non solo a scopo neuroprotettivo nel caso di arresto cardiaco refrattario, ma anche nei casi di posizionamento ECMO post-intervento cardiocirurgico a causa di una severa disfunzione cardiaca col fine di preservare funzione cardiaca e cerebrale.

7 ARRESTO DI CIRCOLO E PERFUSIONE CEREBRALE SELETTIVA

7.1 SCOPO DELLO STUDIO

Il gran numero di studi e pubblicazioni effettuati negli ultimi 30 anni sul danno cerebrale in corso di arresto di circolo fa capire quanto questo argomento sia tutt'oggi fonte di preoccupazione e quindi di continua ricerca da parte di medici, cardiocirurghi, anestesisti e altre figure professionali correlate a questo ambito lavorativo. In questi anni molti progressi sono stati fatti e hanno portato a numerosi miglioramenti delle tecniche di perfusione cerebrale, quali ACP e RCP, ideate per interrompere il meno possibile il flusso cerebrale ma anche di altre tecniche che permettono di mantenere il flusso di sangue diretto a tutti gli organi splancnici. Oltre alle diverse, e talvolta complesse, tecniche di perfusione un altro aspetto fondamentale su cui è stata posta l'attenzione è la gestione della temperatura, in particolare si cerca di ridurre la necessità di utilizzare ipotermia profonda per ridurre i tempi tecnici dell'intervento e per ridurre al minimo quelli che possono essere gli effetti avversi indotti da uno stato ipotermico profondo prolungato.

Tuttavia, la quantità di dati ottenuti con tecniche chirurgiche diverse, diverse temperature e diverse tecniche di perfusione può essere fonte di confusione. Mentre le diverse tecniche di perfusione sembrano senza dubbio aver ridotto il rischio di danno cerebrale quale sia la migliore temperatura da mantenere durante l'arresto di circolo con o senza perfusione cerebrale non è ancora chiaro.

È altresì vero che spesso l'outcome neurologico del paziente può essere indipendente dalle tecniche di protezione adottate e dipendere dalla complessità e dall'urgenza della malattia con cui il paziente viene portato in sala operatoria e da altri fattori propri della persona: grado di aterosclerosi cerebrale, età, sesso, malattie genetiche correlate a formazione di aneurismi e predisposizione alla dissezione aortica.

La mancanza di linee guida definite che possano dirigere le scelte del chirurgo durante l'intervento permette ai diversi centri e ai diversi chirurghi di attuare metodiche e gradi di ipotermia a scelta basandosi esclusivamente sulle proprie conoscenze e l'intenzione di non nuocere al paziente.

In questo contesto lo sviluppo di un modello sperimentale affidabile, standardizzato, ripetibile e a basso costo che ricrei le condizioni presenti in sala operatoria che possa permettere di effettuare arresti di circolo confrontabili con l'attuazione di tecniche di protezione cerebrale

nuove e con la possibilità di poter studiare il danno ischemico cerebrale direttamente sul cervello dell'animale potrebbe aiutare a definire quale sia il miglior range di temperatura da adottare durante chirurgia dell'arco aortico e quali siano i veri effetti protettivi dati dal mantenimento della perfusione cerebrale, con una migliore comprensione dei principi e dei limiti dell'arresto di circolo in ipotermia profonda.

Questo studio si propone di valutare innanzitutto l'efficacia di un nuovo modello sperimentale di perfusione cerebrale selettiva durante arresto di circolo nel ratto.

Dopo aver verificato la possibilità tecnica di poter effettuare tale modello abbiamo voluto valutare quali siano i danni neurologici cui normalmente il paziente va incontro durante arresto di circolo in ipotermia profonda, in normotermia e con il supporto della perfusione cerebrale selettiva in ipotermia moderata.

A questo punto abbiamo voluto anche verificare gli effetti neuro protettivi di ALM che è stata infusa assieme al sangue utilizzato per la perfusione cerebrale durante l'arresto di circolo. Per valutare gli aspetti neuro protettivi abbiamo effettuato studi sull'EEG che è stato registrato per tutta la durata della procedura, e al termine dell'esperimento è stato prelevato il cervello per effettuare uno studio istologico e uno studio di biologia molecolare alla ricerca di alcuni marker di danno ischemico e di morte cellulare.

7.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO

I ratti sono stati divisi in 6 gruppi che sono stati distinti in base al trattamento ricevuto durante la fase di arresto di circolo che poteva prevedere o no la perfusione cerebrale (CP) e in base alla temperatura corporea cui è stato effettuato l'arresto di circolo:

- 1) **NCA** arresto di circolo in normotermia (35-36°C) senza perfusione cerebrale (n=10)
- 2) **DHCA** arresto di circolo in ipotermia profonda (18-20°C) senza perfusione cerebrale (n=10)
- 3) **NCA + CP** arresto di circolo in normotermia (35-36°C) e perfusione cerebrale (n=10)
- 4) **DHCA + CP** arresto di circolo in ipotermia profonda (18-20°C) e perfusione cerebrale (n=10)
- 5) **MHCA + CP** arresto di circolo in ipotermia moderata (27-28°C) e perfusione cerebrale (n=10)
- 6) **ALM + CP** arresto di circolo in normotermia (35-36°C) e perfusione cerebrale e infusione della soluzione ALM (n=10)

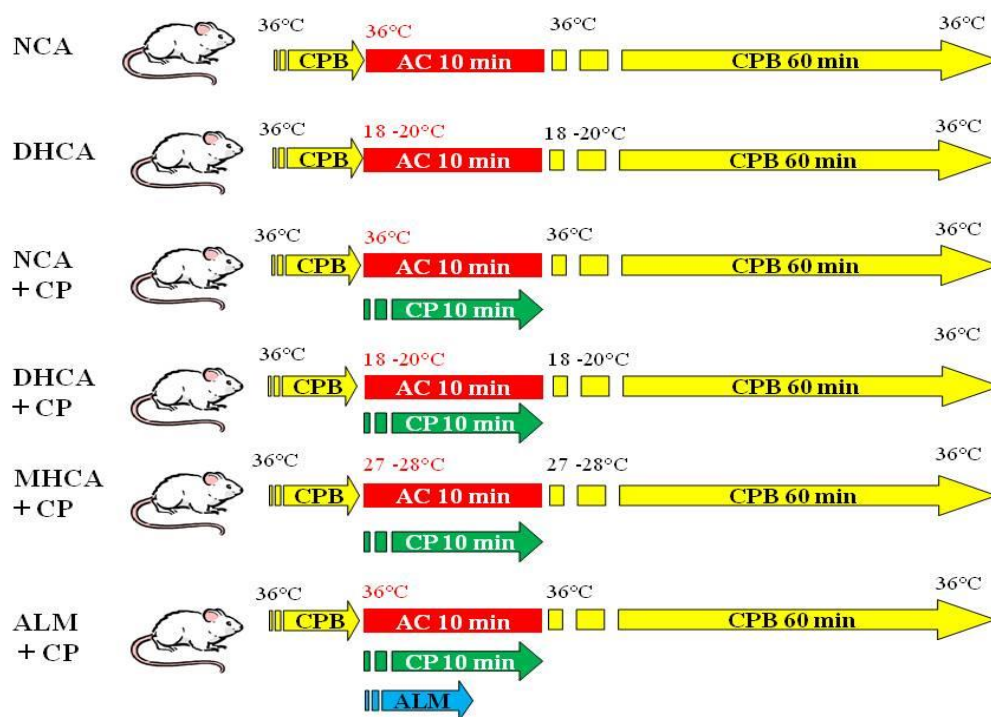


Figura 41: Protocollo sperimentale, si distinguono 6 gruppi diversi che si diversificano per la presenza o meno di perfusione cerebrale (CP) durante il periodo di arresto di circolo (AC) di 10 minuti, al termine dell'arresto di circolo la circolazione extracorporea (CPB) permetteva una riperfusione della durata di 60 minuti. Nell'ultimo gruppo durante l'arresto di circolo e la perfusione cerebrale viene infusa direttamente nel circolo cerebrale una soluzione composta da adenosina, lidocaina e magnesio solfato denominata ALM per 2 minuti

TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

ALM una soluzione composta da Adenosina 1mM, Lidocaina 3mM e Magnesio Solfato 2,5 mM diluite in 1 ml, è stata somministrata direttamente nel circolo cerebrale con una pompa siringa collegata al circuito del CPB a valle della cannula 26 G inserita nella carotide comune e diretta verso il cranio, la somministrazione del farmaco avveniva nei 2 minuti iniziali della perfusione cerebrale, dopodiché la pompa siringa veniva fermata mentre la perfusione cerebrale con solo sangue continuava per altri 8 minuti fino al termine del periodo di arresto di circolo.

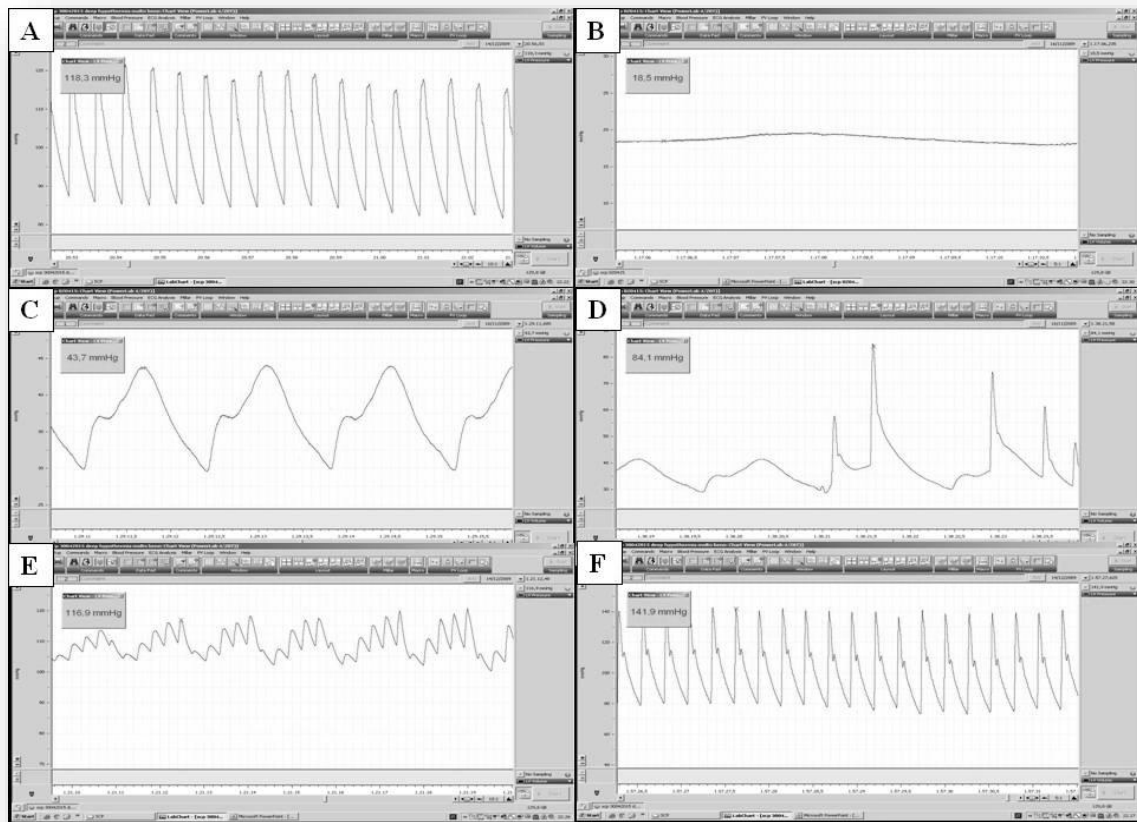


Figura 42: Durante tutta la procedura la pressione arteriosa è stata monitorizzata in maniera continua. A) pressione arteriosa iniziale; B) arresto di circolo; C) circolo sostenuto da CPB; D-E) ripresa spontanea della contrattilità cardiaca; F) pressione arteriosa dopo svezzamento da CPB

7.3 RISULTATI

BIOLOGIA MOLECOLARE

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata con Kruskal-Wallis/Dunn's Multiple Comparison Post hoc Test ed i valori sono significativi per $p < 0.05(*)$.

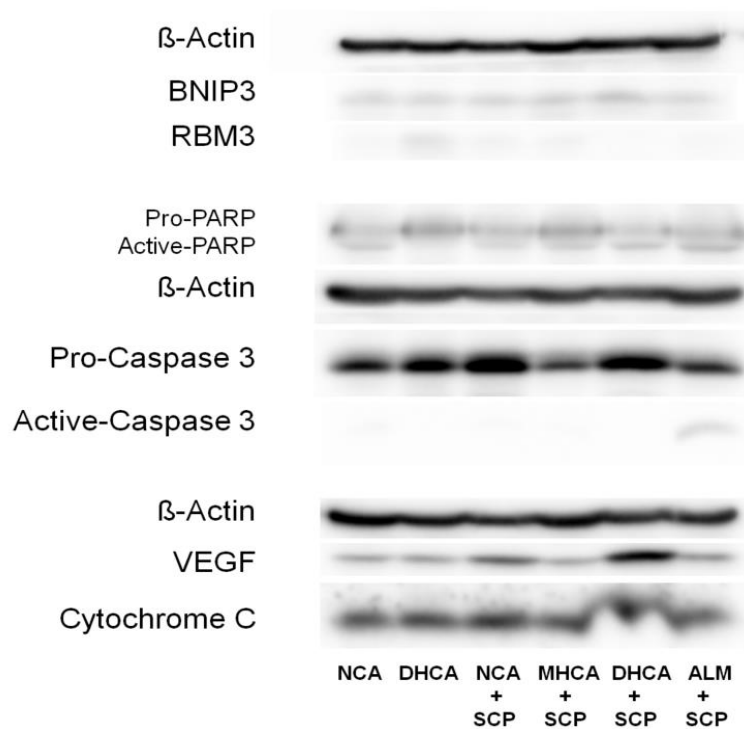


Figura 43: Western Blot delle proteine analizzate dei diversi gruppi considerati. BNIP3: BCL2 interacting protein 3; RBM3: RNA Binding Motif Protein 3; PARP: Poli ADP-ribosio polimerasi; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Le *caspasi* sono un gruppo di proteasi con cisteina nel sito attivo che possono tagliare altre proteine dopo un residuo di acido aspartico, caspasi 3 in particolare fa parte di un gruppo definito come caspasi effettrici che tagliano precisi substrati proteici dando corso al processo apoptotico.

PARP (Poli ADP-ribosio polimerasi) invece fa parte di una famiglia di proteine composta da 17 membri che hanno struttura e funzione differente all'interno della cellula, il suo ruolo principale è quello di individuare e segnalare le rotture a singolo filamento del DNA all'apparato enzimatico coinvolto nella riparazione. L'attivazione di PARP consiste di un'immediata risposta cellulare a danni metabolici, chimici e indotti da radiazioni ai singoli filamenti di DNA. Quando PARP individua una rottura si lega al DNA, e, dopo cambi strutturali, inizia la sintesi di catene di poli ADP-ribosio che fungono da segnale per altri

enzimi di riparazione del DNA come la DNA ligasi III, DNA polimerasi beta e proteine scaffold di sostegno.

L'attivazione di queste 2 proteine aumenta durante i processi apoptotici, la riduzione dell'espressione di tali proteine durante arresto di circolo ipotermico, indica invece un ruolo protettivo.

VEGF o fattore di crescita dell'endotelio vascolare viene prodotto in cellule che non ricevono un apporto sufficiente di ossigeno: quando una cellula è in ipossia, essa produce HIF (Hypoxia Inducible Factor), un fattore di trascrizione che stimola il rilascio di VEGF in grado di forzare il processo di angiogenesi. L'espressione di VEGF è un meccanismo di protezione e stimolazione della proliferazione e sopravvivenza cellulare in caso di danno ipossico-ischemico.

RBM3 si attiva con lo shock termico ed è fondamentale per prevenire la perdita di cellule cerebrali e delle loro connessioni quando la temperatura corporea scende a livelli pericolosi, *RBM3* favorisce il ripristino della normale attività cerebrale. La sua espressione ha quindi un effetto neuro protettivo.

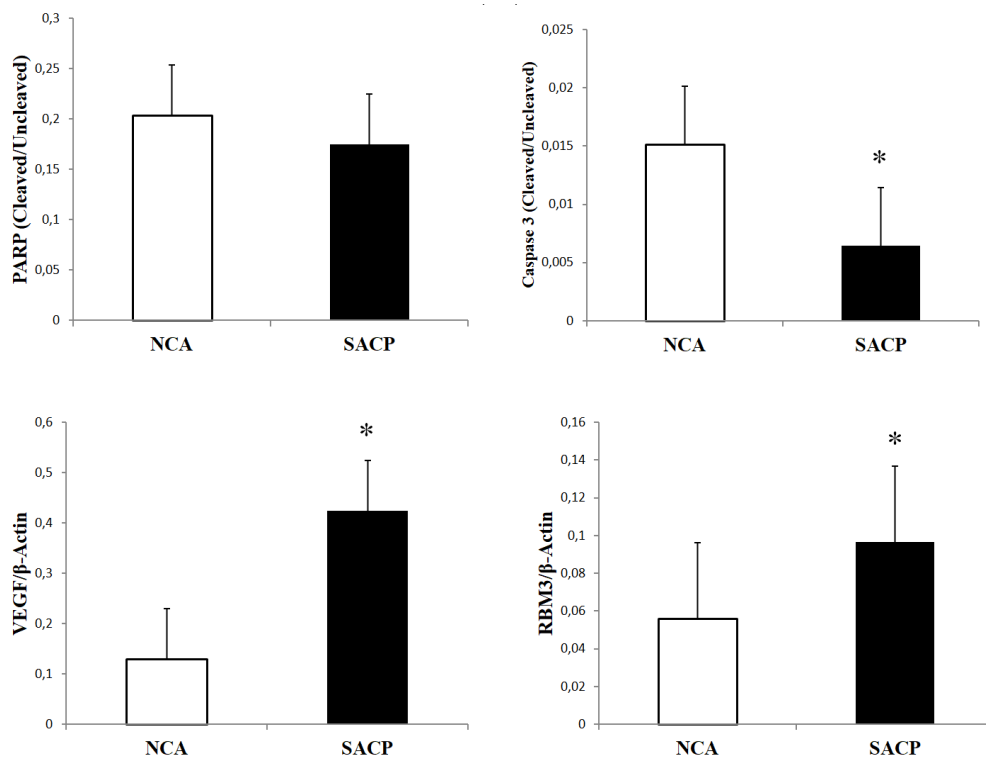


Figura 44: Analisi western Blot delle proteine PARP, Caspase 3, VEGF e RBM3 nei 2 gruppi a confronto NCA (arresto di circolo normotermico) e SACP (perfusione cerebrale selettiva anterograda). PARP: Poli ADP-ribosio polimerasi; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; RBM3: RNA Binding Motif Protein 3.

In prima analisi sono stati confrontati i gruppi sottoposti a perfusione cerebrale anterograda selettiva (SACP) con ipotermia moderata e profonda con i ratti sottoposti ad arresto di circolo normotermico. I ratti sottoposti a SACP mostrano una riduzione degli indici proapoptotici (PARP e Caspasi 3) e un aumento degli indici di proliferazione e protezione cellulare (VEGF e RBM3). (Figura 44)

Per confrontare il grado di apoptosi nei diversi gruppi sono stati presi in analisi altri 2 indici pro-apoptotici: Citocromo c e BNIP3.

Il *citocromo c* è un intermedio nel processo di apoptosi, è rilasciato dai mitocondri in risposta agli stimoli pro-apoptotici. Il rilascio di piccole quantità di cyt c provoca una interazione con il recettore IP3 (inositolo trifosfato) sul reticolo endoplasmatico, causando il rilascio di ioni calcio. L'aumento totale del calcio innesca un meccanismo a feedback positivo tale da provocare un rilascio di quantitativi citotossici di Ca^{2+} per interazione con il recettore IP3. Tale rilascio a sua volta attiva la caspasi 9 che può quindi attivare le caspasi 3 e 7 responsabili della morte delle cellule.

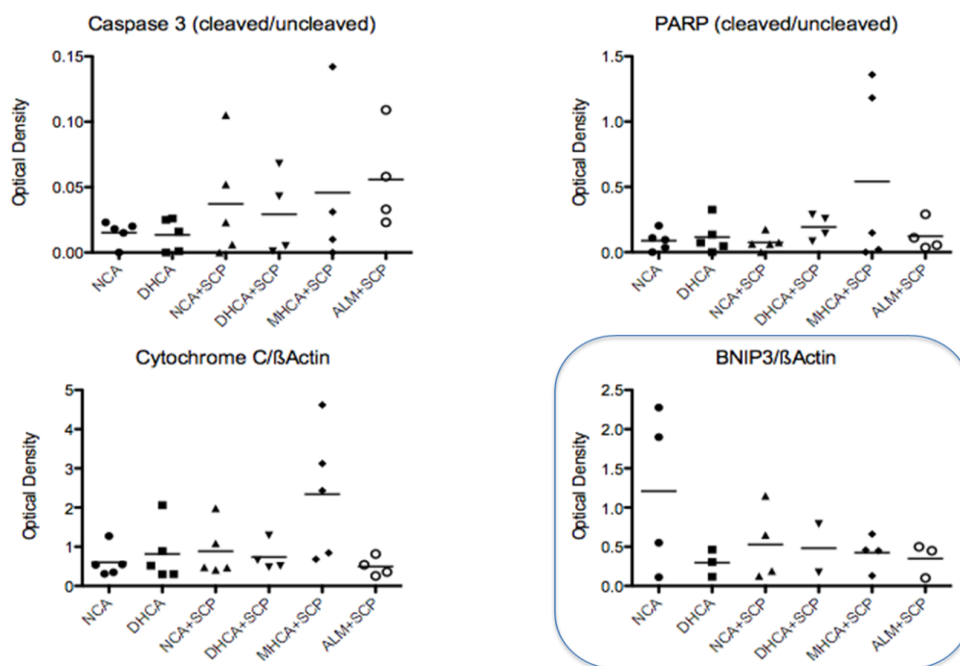


Figura 45: Espressione grafica dell'analisi western blot di Caspasi 3, PARP Citocromo C e BNIP3.

NCA = arresto di circolo normotermico; NCA + CP = arresto di circolo normotermico con perfusione cerebrale; DHCA = arresto di circolo in ipotermia profonda; DHCA + CP = arresto di circolo in ipotermia profonda con perfusione cerebrale; MHCA + CP = arresto di circolo in ipotermia moderata con perfusione cerebrale; ALM + CP = arresto di circolo normotermico con perfusione cerebrale e somministrazione di ALM. PARP: Poli ADP-ribosio polimerasi; BNIP3: BCL2 interacting protein 3.

BNIP3 interagisce con la proteina E1B 19 kDa che è responsabile per la protezione della morte cellulare indotta da virus, così come le sequenze E1B 19 kDa-like di *BCL2*, anche esso un protettore apoptotico. Questo gene contiene un dominio BH3 e un dominio transmembrana, che sono stati associati alla funzione pro-apoptotica. La proteina dimerica mitocondriale codificata da questo gene è nota per indurre apoptosi.

Tutte queste proteine analizzate al western blot sono indici di apoptosi e marker di danno cellulare. Il confronto dei dati rilevati ai 6 gruppi presi singolarmente e confrontati con il gruppo di controllo con arresto di circolo normotermico, cioè in assenza di protezione cerebrale, non ha mostrato differenze significative tra i vari gruppi ad eccezione di *BNIP3*.

BNIP3 infatti risulta significativamente più espressa in assenza di qualsiasi forma di protezione cerebrale cioè nel gruppo NCA. (Figura 45)

Anche nell'analisi di *VEGF* e *RBM3* non sono state riscontrate differenze significative tra i singoli gruppi e il gruppo NCA anche se in questo caso un trend positivo con significato neuro protettivo è visibile nei gruppi con SCP. (Figura 46)

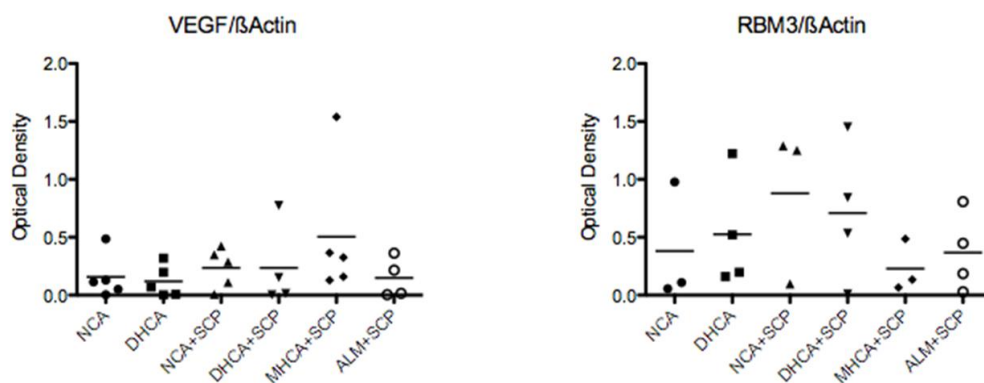


Figura 46: Espressione grafica dell'analisi western blot di *VEGF* e *RBM3*.

NCA = arresto di circolo normotermico; NCA + CP = arresto di circolo normotermico con perfusione cerebrale; DHCA = arresto di circolo in ipotermia profonda; DHCA + CP = arresto di circolo in ipotermia profonda con perfusione cerebrale; MHCA + CP = arresto di circolo in ipotermia moderata con perfusione cerebrale; ALM + CP = arresto di circolo normotermico con perfusione cerebrale e somministrazione di ALM. *VEGF*: Vascular Endothelial Growth Factor; *RBM3*: RNA Binding Motif Protein 3.

EEG

L'analisi EEG è stata effettuata su 15 ratti, ed è stata eseguita su solo 4 dei 6 gruppi iniziali, quelli cioè che sono stati ritenuti essere i gruppi con maggior rilevanza clinica a causa dalla mancanza di un numero adeguato di ratti che avessero subito l'impianto degli elettrodi: il gruppo NCA (4), il gruppo DHCA (4), il gruppo MHCA + CP (4) e il gruppo ALM + CP (3). L'analisi spettrale dell'EEG è stata effettuata a livello della corteccia parietale, frontale e a livello del talamo per l'emisfero destro e sinistro, sono stati posti a confronto l'attività basale ottenuta a ratto anestetizzato, intubato e ventilato meccanicamente che precede la fase di ischemia e l'attività elettrocorticale durante la fase di ischemia (10 minuti) e durante la reperfusionne successiva (circa 30 minuti).

Come riportato in materiali e metodi è stata eseguita un'analisi spettrale dell'EEG (PSD) che riporta la variazione di frequenza e di ampiezza del segnale nel tempo. In questo modo viene quindi analizzata l'intensità del segnale ed è possibile distinguere momenti di alta attività elettrocorticale da momenti di bassa attività. Questo tipo di analisi consente uno studio della sola attività neuronale ma non rileva se tale attività sia o no patologica. Momenti di intensa attività del segnale potrebbero corrispondere a momenti di crisi epilettiche in cui le onde EEG hanno un'alta frequenza e ampiezza. Per capire se effettivamente questa attività intensa rilevata attraverso PSD sia o meno corrispondente a segnali patologici bisogna tornare al tracciato EEG originario di ciascun ratto.

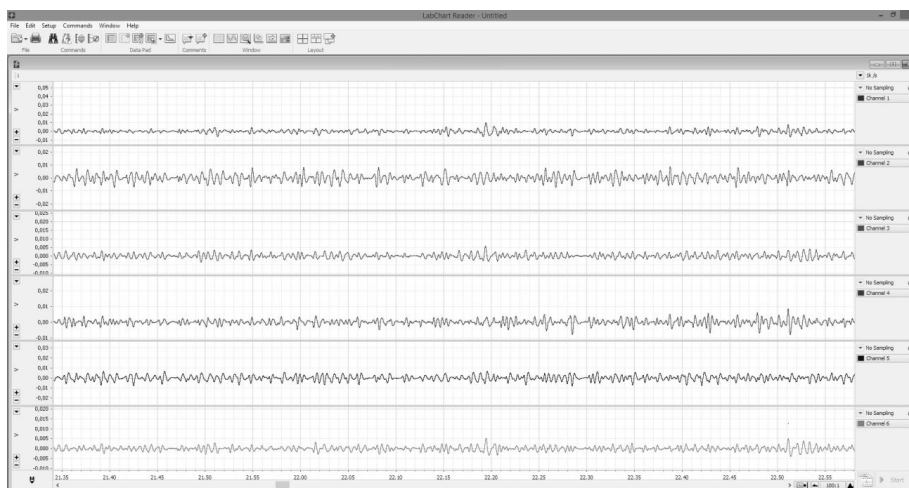


Figura 47: Attività basale elettrocorticale registrata con animale in anestesia con sevofluorano, intubato e ventilato meccanicamente. I 6 canali rappresentano l'EEG registrato dagli elettrodi posti a livello della corteccia parietale, frontale e del talamo per l'emisfero destro e sinistro.

Nel gruppo NCA risulta evidente come quasi immediatamente dopo l'inizio dell'arresto di circolo vi sia una riduzione dell'attività elettrica fino alla completa scomparsa e vi sia poi una ripresa lenta dell'attività dopo la fine dell'arresto di circolo e la ripresa del CPB. La brusca interruzione della perfusione cerebrale porta al passaggio da un metabolismo cellulare aerobio a un metabolismo anaerobio e di conseguenza a una rapida deplezione dell'ATP cellulare determinando una completa cessazione dell'attività neuronale. Inoltre, dall'analisi PSD si evince come anche al termine dei 10 minuti di arresto di circolo la bassa attività elettrica persista forse a causa del deficit di ossigeno riscontrato dai neuroni durante la fase di arresto di circolo che permette solo una lenta ripresa. Si nota inoltre come nella corteccia parietale e frontale la ripresa non sia ancora presente dopo parecchi minuti, forse a espressione di un danno regionale persistente. (Figura 48)

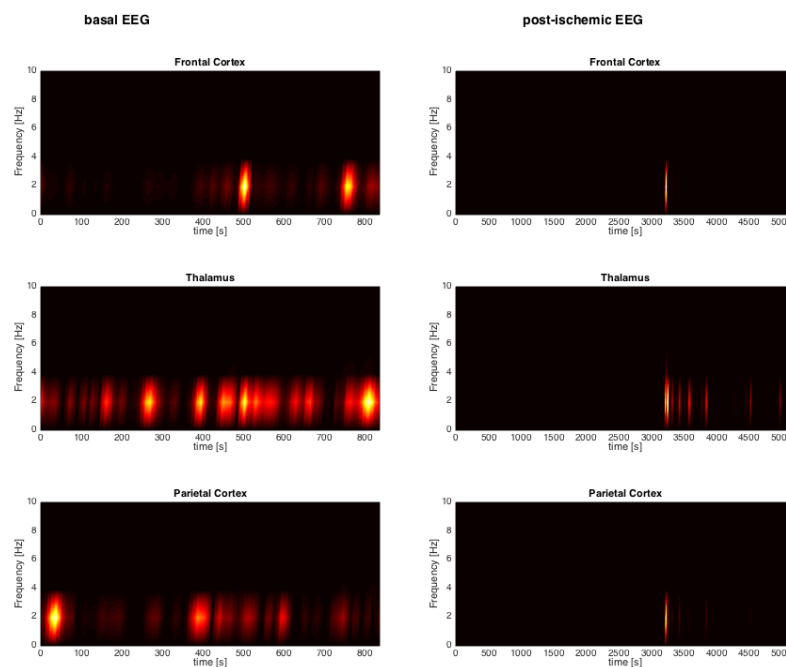


Figura 48: Analisi spettrale dell'EEG del gruppo normotermico (NCA) dell'emisfero sx. L'attività elettrica si riduce e quasi scompare durante il periodo di arresto di circolo e per parecchi minuti dopo la ri-perfusione.

Nel gruppo DHCA l'attività elettrocorticale si riduce con l'abbassarsi della temperatura, all'EEG si nota infatti una riduzione dell'intensità e della frequenza delle onde rilevate, tuttavia a differenza del gruppo NCA non si assiste a un silenzio elettrico, anche in assenza di perfusione cerebrale durante i 10 minuti di arresto di circolo l'attività elettrica, seppure in maniera ridotta, continua e dopo la riperfusione vi è un'immediata ripresa a valori simili a quelli pre-arresto. Probabilmente la riduzione del consumo di ossigeno e il rallentamento dell'attività cellulare sono sufficienti a mantenere la cellula nervosa ancora attiva per la durata di 10 minuti non mostrando quindi una sofferenza per il deficit di ossigeno causato dall'assenza di perfusione. Probabilmente l'effetto sarebbe diverso se il tempo di arresto di circolo fosse più lungo. È noto infatti come l'utilizzo di DHCA sia ritenuto sicuro per periodi inferiori ai 30 minuti. (Figura 49)

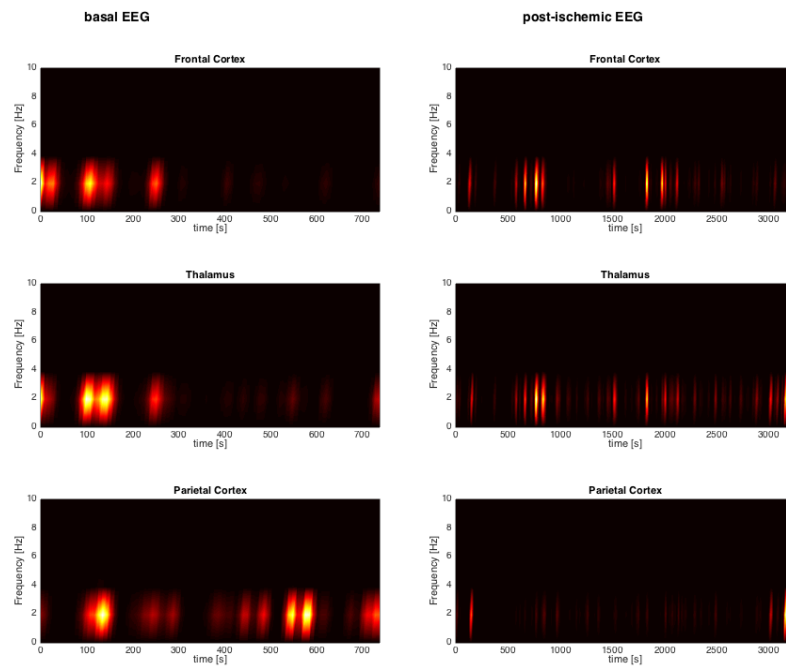


Figura 49: Analisi PSD del gruppo trattato con ipotermia profonda dell'emisfero sx. L'attività elettrocorticale seppure ridotta continua anche durante il periodo di arresto di circolo.

Anche nel gruppo MHCA + CP l'attività elettrocorticale durante l'arresto di circolo non subisce interruzioni, il supporto di ossigeno mantenuto dalla perfusione attraverso la carotide sinistra mantiene quindi l'attività neuronale e poca differenza si nota nell'analisi spettrale dell'EEG durante arresto di circolo rispetto al livello basale o alla riperfusione. In alcuni dei ratti trattati con MHCA e CP è stato possibile individuare un aumento dell'ampiezza e della frequenza dell'onda EEG con scariche polimorfe che si ripetevano nel tempo proprio durante il periodo di perfusione cerebrale, questi complessi possono avere un significato patologico che potrebbe essere causato da una eccessiva presenza di ossigeno o da pressioni di perfusione troppo alte. La sola indagine EEG tuttavia non può rivelare l'effetto patologico di queste scariche. (Figura 50)

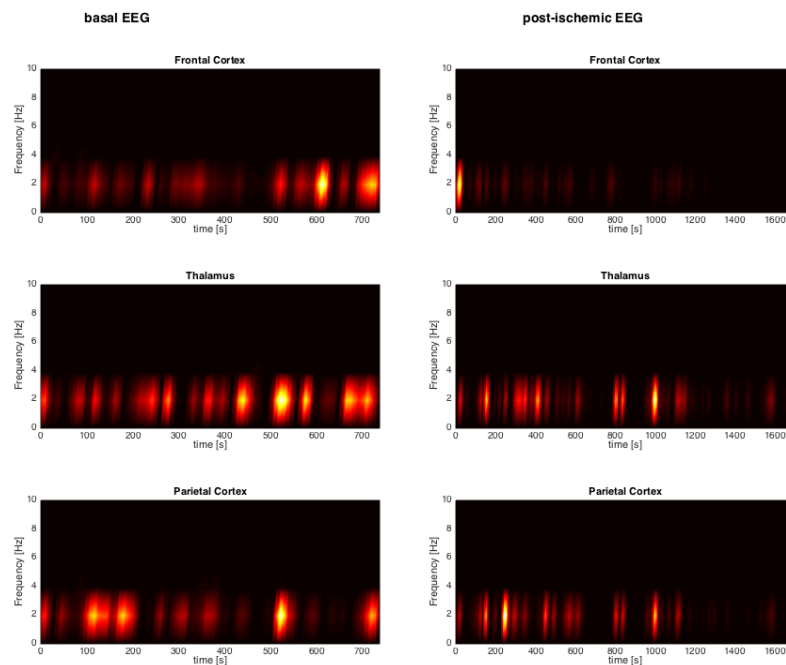


Figura 50: Analisi PSD del gruppo MHCA + CP dell'emisfero sx. Attività elettrica anche intensa è rilevata durante la fase di arresto di circolo e durante la riperfusione.

Interessante risulta infine ciò che succede al gruppo trattato con ALM: all'inizio dell'arresto di circolo inizia la perfusione cerebrale così come nel gruppo MHCA + CP, contemporaneamente inizia l'infusione nel circolo cerebrale di ALM che termina dopo 2 minuti, mentre nella prima fase dell'arresto di circolo l'attività neuronale viene mantenuta dalla perfusione dopo alcuni secondi dall'inizio dell'infusione di ALM si assiste ad una netta riduzione dell'attività elettrica fino al silenzio del segnale EEG (EEG piatto), dimostrando l'effetto polarizzante della soluzione ALM. Questo effetto si protrae per molti minuti anche

dopo la fine dell'arresto di circolo con la ripresa di una minima attività solo dopo circa 30 minuti di riperfusione. (Figure 51,52 e 53)

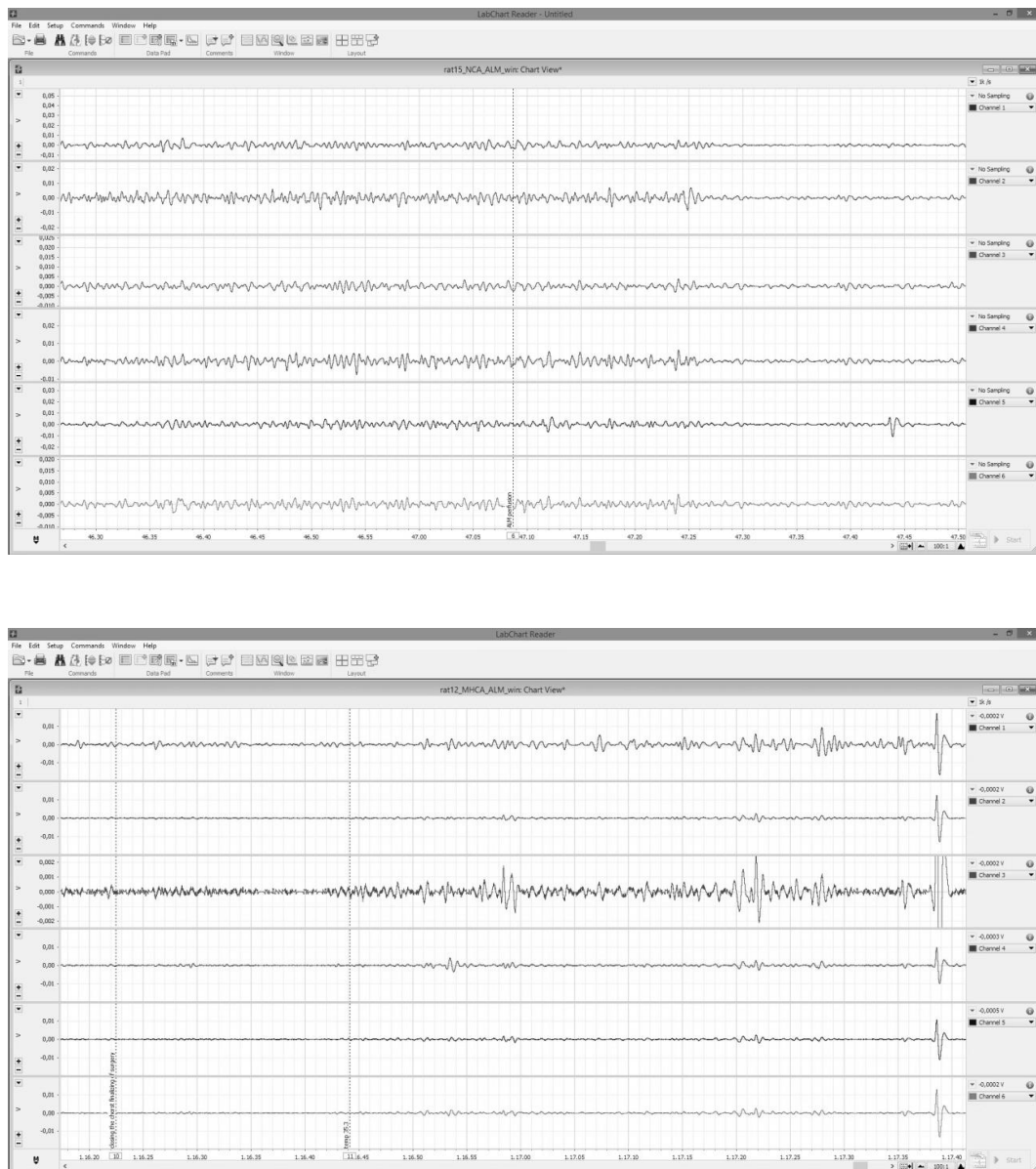


Figura 51 e 52: Registrazione di EEG in tempo reale di un ratto trattato con ALM + CP dopo pochi secondi dall'inizio dell'infusione di ALM c'è una netta riduzione dell'ampiezza del segnale EEG. Una ripresa iniziale dell'attività elettrica si riscontra dopo circa 30 minuti di riperfusione. I 6 canali rappresentano l'EEG registrato dagli elettrodi posti a livello della corteccia parietale, frontale e del talamo per l'emisfero destro e sinistro.

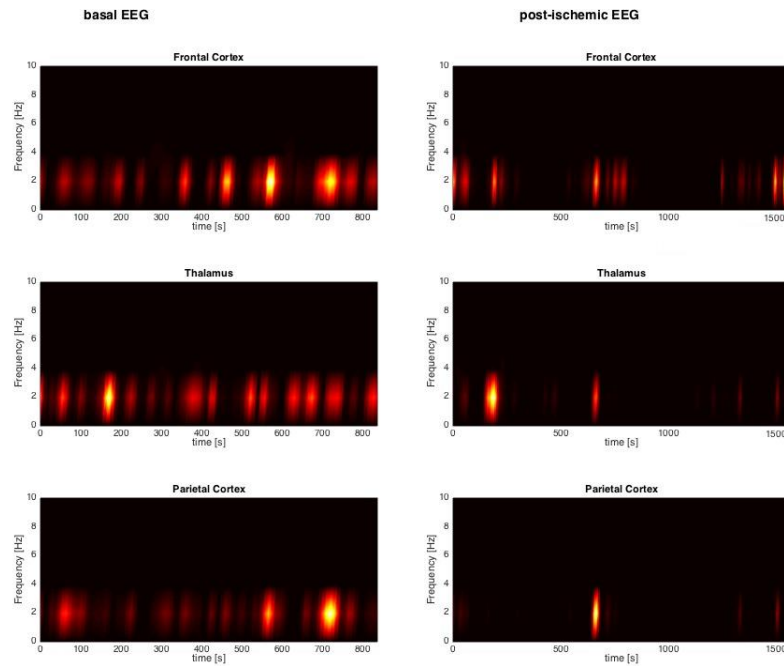


Figura 53: *Analisi spettrale dell'EEG del gruppo trattato con ALM dell'emisfero sx. A confronto i valori basali con quelli riscontrati durante l'arresto di circolo e durante riperfusione.*

Va inoltre riportato come andando a osservare ogni singolo tracciato EEG si riscontri la presenza di scariche epilettiche in 3 ratti del gruppo NCA subito dopo la riperfusione probabilmente come espressione del danno da ischemia e riperfusione, e in 2 ratti del gruppo DHCA probabilmente per un riscaldamento effettuato troppo velocemente.

Nel gruppo con perfusione cerebrale e ipotermia moderata non si sono riscontrate scariche riferibili a crisi epilettiche seppure altre forme d'onda patologiche siano state individuate all'EEG, con numerose scariche polimorfe che potrebbero avere significato patologico.

Nel gruppo trattato con ALM invece non si sono rilevate scariche anomale, persisteva anzi uno stato di ridotta ampiezza e frequenza dell'attività elettrica.

Sicuramente sia l'ipotermia profonda sia la presenza di perfusione cerebrale consentono un rapido recupero dell'attività elettrica cerebrale e una minore riduzione della densità spettrale dell'EEG.

ISTOLOGIA

La valutazione istopatologica si è concentrata a livello della regione CA1 dell'ippocampo e dei nuclei basali che sono solitamente le aree che per prime risentono di un'ischemia globale.

Il confronto visivo di fette corrispondenti ha potuto evidenziare la presenza di neuroni dall'aspetto degenerativo con la presenza di nucleo picnotico e ipereosinofilia del citoplasma (neuroni rossi) presente in tutti i gruppi analizzati.

Anche in questo caso abbiamo voluto innanzitutto validare il modello ponendo a confronto i ratti del gruppo NCA con quelli con SACP. Risulta evidente la differenza tra questi 2 diversi gruppi confermando la validità del nostro modello di perfusione cerebrale selettiva.

Analizzando l'istologia de singoli gruppi anche nel gruppo DHCA è evidente una riduzione del danno istologico rispetto a NCA. Non è stata invece rilevata una differenza significativa negli altri gruppi sottoposti a trattamento (NCA + SCP, ALM + SCP).

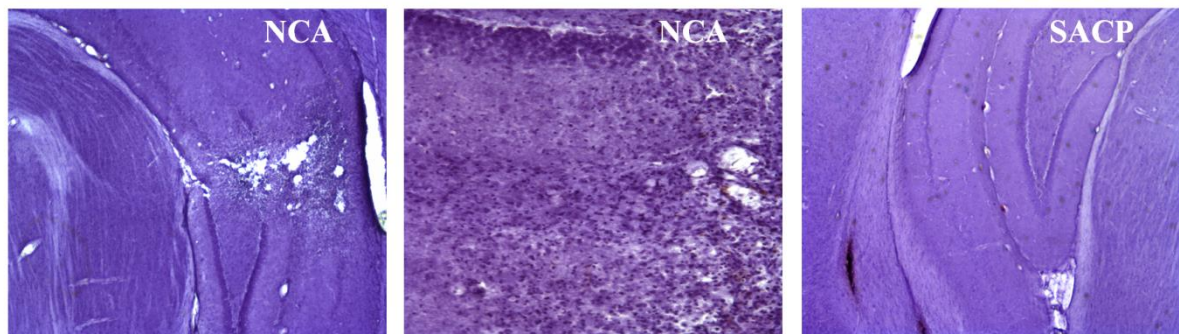


Figura 54: Regione CA1 colorata con ematossilina di un gruppo sottoposto ad arresto di circolo norotermico (NCA) ed un gruppo sottoposto a arresto di circolo ipotermico con perfusione cerebrale selettiva (SACP).

7.4 DISCUSSIONE

L'arresto di circolo ipotermico ancora oggi è una tecnica molto utilizzata durante chirurgia dell'arco aortico. Nel corso degli ultimi 40 anni da quando cioè nel 1975 sono stati presentati i primi casi di arresto di circolo ipotermico durante CPB da Griepp e colleghi numerosi passi avanti sono stati fatti per poter rendere l'arresto di circolo maggiormente sicuro e ridurre al minimo il rischio di danno neurologico.⁸⁶ Tra fine anni '90 e inizio 2000 dapprima DeBakey e poi Bachet e Kazui hanno dimostrato la possibilità di ridurre il tempo di ischemia cerebrale attraverso la tecnica di ACP.^{98,99,100,101} Tuttavia nonostante nuove tecniche di perfusione, di gestione del paziente e di monitoraggio di un'adeguata protezione cerebrale la chirurgia dell'arco aortico continua a essere gravata da un alto numero di esiti neurologici che possono essere sia lievi e temporanei sia gravi o persino fatali. Numerosi studi clinici in diversi centri sono stati eseguiti per confrontare l'efficacia di DHCA piuttosto che di ACP o RCP, tuttavia ancora oggi nessuno ha dimostrato con certezza la maggiore efficacia di una tecnica rispetto a un'altra.

Quello che risulta ormai certo è che l'ipotermia possiede un ruolo fondamentale nella protezione cerebrale dal danno ischemico e che sicuramente mantenere una perfusione durante l'arresto di circolo permette di allungarne il tempo di sicurezza.

L'ipotermia però possiede anche affetti avversi: altera clearance dei farmaci, determina vasocostrizione, piastrinopatia, aritmie, disfunzione dei tubuli renali, aumento rischio infezioni ecc. per questo negli ultimi anni, soprattutto in seguito alla diffusione dell'utilizzo di ACP, sono sempre di più i chirurghi che accettano un grado di ipotermia minore non raggiungendo quindi temperature tali da determinare ipotermia profonda ma mantenendo invece un'ipotermia moderata durante l'arresto di circolo. Inducendo ipotermia moderata si vanno a ridurre gli effetti avversi causati dall'ipotermia non solo per il grado di profondità dell'ipotermia che viene raggiunto ma anche per la riduzione dei tempi di raffreddamento e di riscaldamento, si riduce quindi l'intervallo di tempo in cui il paziente è in ipotermia e il tempo di CPB. Questo tipo di tecnica ha dato buoni risultati, non esistono tuttavia studi che ne determinino una superiorità di protezione rispetto a DHCA così come non esiste un accordo su quale deve essere il range di temperatura da mantenere. Nonostante l'enorme quantità di studi dedicata a questo argomento non esiste infatti un accordo generale su quale sia la tecnica di perfusione migliore e quale sia il range di temperatura da mantenere durante l'arresto di circolo. Tutti gli studi infatti sono gravati da un certo numero di danni neurologici avversi che possono spesso essere causati da caratteristiche proprie del paziente o dell'intervento: pazienti

più anziani, con un grado di aterosclerosi cerebrale più alto, e un'ipotermia cerebrale non uniforme, con una patologia aortica particolarmente complessa che necessita di una ricostruzione più elaborata e più lunga.²³⁸

Da tutto questo si evince come per avere dei dati significativi e poter determinare se una tecnica sia superiore all'altra e quale sia il range di temperatura da mantenere per avere la massima protezione e i minimi effetti avversi gli studi dovrebbero essere effettuati su interventi di uguale durata e uguale complessità e su pazienti con le stesse caratteristiche e dovrebbero prevedere analisi del danno cerebrale diverse dal solo andamento clinico post-intervento. Per questo un ruolo importante è rivestito dagli studi sperimentali: lo studio su animale permette infatti di standardizzare il tipo di intervento ed il tipo di trattamento con minime variabilità tra un animale e l'altro, permette inoltre di poter avere non solo valutazioni cliniche ma analisi istopatologiche e di biologia molecolare in grado di approfondire la conoscenza sul danno cerebrale verificatosi nei vari esperimenti, e ancora, permette di poter testare farmaci con proprietà neuro protettive che si possono somministrare per via sistemica o direttamente attraverso la perfusione cerebrale durante arresto di circolo.

Proprio per tali ragioni abbiamo sviluppato un modello di arresto di circolo e perfusione cerebrale su piccolo animale in maniera da ridurre i costi e rendere possibile un grande numero di esperimenti. Prima di tutto lo scopo dello studio era validare questo modello valutando l'efficacia della perfusione cerebrale rispetto alla sua assenza e quindi al completo arresto di circolo. Per fare questo abbiamo confrontato un gruppo che ha subito un arresto di circolo in normotermia rispetto al gruppo con arresto di circolo in normotermia e perfusione cerebrale, dopodiché abbiamo rappresentato i gruppi dal significato clinico più rilevante: un gruppo con ipotermia profonda, un gruppo con ipotermia profonda e perfusione cerebrale ed un gruppo con ipotermia moderata e perfusione cerebrale; infine abbiamo studiato un gruppo a cui oltre alla perfusione cerebrale ematica è stato somministrato direttamente nel circolo cerebrale un farmaco che si ritiene avere proprietà neuro protettive: ALM.

Per ciascuna delle sue componenti, infatti, la letteratura è ricca di conferme sull'efficacia anti apoptotica e protettiva di Adenosina, Lidocaina e Magnesio contro il danno da ischemia cerebrale.

I cervelli prelevati a fine procedura, dopo un'ora di ri-perfusione, sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e sottoposti ad analisi per quantificare la risposta apoptotica nei diversi gruppi di ratti.

In prima istanza sono state analizzate tramite western blot l'espressione di 2 proteine con attività antiapoptotica differenziando un gruppo con arresto di circolo normotermico (NCA) e

un gruppo sottoposto a perfusione cerebrale anterograda selettiva (SACP) al fine di validare il modello. In questo caso Caspasi 3 e PARP risultano meno espresse nel gruppo SACP in cui quindi si ha una riduzione dell'apoptosi, dato confermato anche dall'aumento in questo gruppo delle proteine VEGF e RBM3 che possiedono attività neuroprotettiva. L'efficacia del modello sperimentale è confermata anche dall'istologia; è possibile infatti vedere una maggior presenza di neuroni danneggiati con nucleo picnotico ed ipereosinofilia nei ratti del gruppo NCA. (Figura54)

Successivamente sono stati analizzati tutti i 6 gruppi compresi nello studio effettuando il western blot anche di altre 2 proteine ad attività pro-apoptotica: Citocromo c e BNIP3

L'aggiunta di ulteriori marker è stata resa necessaria per la mancanza di dati significativi che rilevassero le differenze tra i vari gruppi sottoposti a trattamento. Solo BNIP3 risulta significativamente ridotto nei gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo (NCA)

BNIP3 infatti risulta significativamente più espressa in assenza di qualsiasi forma di protezione cerebrale. Questo risultato era atteso anche negli altri marker di apoptosi ma l'analisi non ha confermato quanto previsto. Risulta infatti difficilmente comprensibile come anche nel gruppo DHCA non ci sia una netta riduzione dell'espressione delle proteine pro-apoptotiche. È possibile che l'ischemia di 10 minuti non sia sufficiente ad evidenziare le differenze tra i vari metodi che già sappiamo essere efficaci. Sebbene infatti l'effetto di ALM impiegato durante SACP sia del tutto da scoprire non è nuovo l'effetto di DHCA durante arresto di circolo e pertanto ci aspettavamo dei dati che confermassero quanto già noto. Ulteriori indagini con un numero maggiore di ratti e un numero inferiore di gruppi di trattamento e con dei tempi più lunghi di ischemia e di riperfusione saranno necessari per poter ottenere dei risultati migliori e più significativi. Stessa cosa si può dire per i marker di neuroprotezione (VEGF e RBM3).

Il monitoraggio intraoperatorio con EEG è un metodo utilizzato per valutare lo stato di anestesia e di coscienza del paziente e il grado di neuro protezione in caso di interventi con rischio di danno neurologico come si verifica durante l'arresto di circolo nella chirurgia dell'arco aortico. Uno dei marker utilizzati per garantire uno stato di protezione cerebrale adeguato negli interventi che prevedano arresto di circolo ipotermico oltre alla temperatura è il silenzio elettroencefalografico. Un paziente sottoposto ad anestesia generale manifesta un tracciato EEG con onde meno ampie e frequenza minore rispetto al paziente sveglio, con presenza nel tracciato di onde tetha e delta piuttosto che alpha e beta, l'ipotermia riduce ulteriormente ampiezza e frequenza delle onde EEG.^{235,236}

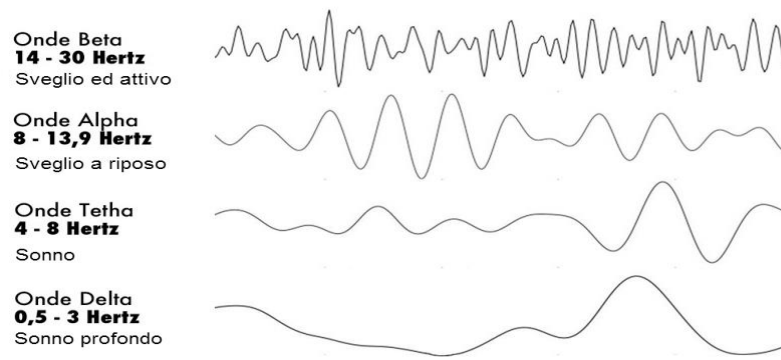


Figura 55: *Principali forme d'onda registrate all'EEG.*

Il raggiungimento del silenzio elettroencefalografico è quindi stato usato come marker di protezione cerebrale durante DHCA, il silenzio però deve giungere prima dell'arresto di circolo a manifesto di una riduzione fino alla totale interruzione del consumo di ossigeno neuronale e dell'attività metabolica cerebrale; se invece il silenzio EEG giunge durante l'arresto di circolo esso potrebbe invece essere causato da un totale consumo dell'ossigeno e un blocco del metabolismo dei neuroni che non sono più in grado di produrre ATP e mancando la fonte di energia iniziano ad andare incontro a fenomeni quali apoptosi e necrosi. Il raggiungimento del silenzio elettroencefalografico tuttavia è molto variabile da paziente a paziente e risulta possibile in tutti i pazienti solo per temperature inferiori ai 13°C ed è anche per questo motivo che oltre all'ipotermia durante l'arresto di circolo vengono impiegati farmaci quali il tiopentale sodico per approfondire lo stato di anestesia.²³⁷ Tuttavia l'utilizzo di temperature così basse per quanto consenta con sicurezza un'ottima protezione cerebrale dal danno ipossico-ischemico determina una serie di effetti avversi e prolunga i tempi di raffreddamento e riscaldamento, di assistenza con CPB e dell'intervento stesso.

Nell'analisi EEG effettuata in questo studio l'ipotermia non induce mai un silenzio EEG completo, poiché le temperature minime raggiunte durante DHCA sono state di 17,5 – 18°C. Un silenzio EEG completo si può rilevare nei ratti del gruppo NCA dove l'attività neuronale si azzerava pochi istanti dopo l'inizio dell'arresto di circolo, in questo caso il silenzio non va ritenuto un protettore ma piuttosto un segno di grave sofferenza da parte del tessuto nervoso che non manifesta più attività perché non ha più metaboliti in grado di consentire i normali processi intracellulari. Inoltre, il silenzio EEG in questo gruppo si protrae ben oltre il periodo di arresto di circolo esprimendo quindi un grave danno cerebrale che non consente il ripristino della normale attività neanche per un lungo tempo dopo la riperfusione, questo tipo di comportamento è solitamente attribuito ad una prognosi negativa. Nel gruppo DHCA come

detto non si è mai raggiunto il silenzio EEG e l'attività cerebrale è stata sempre presente sia durante l'arresto di circolo sia nella fase di riperfusione, chiaramente l'attività era caratterizzata da onde di lieve intensità con bassa frequenza. Il ridotto consumo di ossigeno ha permesso ai neuroni di continuare i propri processi metabolici e quindi a continuare a manifestare attività elettrica, questo è sufficiente a garantire una buona protezione per i 10 minuti di arresto di circolo imposto, tuttavia il metabolismo cellulare non è bloccato e anche se in maniera lenta la cellula continua a consumare ossigeno e quindi presto o tardi giungerà alla fine delle proprie scorte e inizierà il danno ipossico-ischemico. Inoltre, va segnalato la presenza in questo gruppo di onde EEG dal carattere patologico con scariche simil-epiletiche durante la fase di riperfusione e riscaldamento; non sappiamo se queste siano dovute a un danno da ischemia e riperfusione piuttosto che da un riscaldamento troppo aggressivo e veloce. Nel gruppo sottoposto ad ipotermia moderata e perfusione cerebrale l'analisi PSD dell'EEG mostra la presenza di continua attività durante il periodo di arresto di circolo. C'è anzi un incremento dell'attività elettrica durante questo periodo: sicuramente la perfusione cerebrale mantiene i neuroni attivi ed evita il danno ipossico tuttavia la presenza nel tracciato EEG di ogni tratto di onde patologiche con scariche polimorfe simili a scariche epilettiche induce a pensare che pur proteggendo dal danno ischemico anche la perfusione cerebrale possa determinare un danno ancora poco chiaro, forse legato all'elevata presenza di ossigeno nel sangue perfuso o flussi e pressioni troppo elevati. E' molto interessante osservare invece quello che succede con l'infusione di ALM, poco dopo l'inizio della somministrazione l'EEG diventa piatto, l'attività neuronale appare quasi totalmente inibita. Questo è probabilmente dovuto all'effetto polarizzante espresso dalla soluzione, le cellule nervose quindi smettono di inviare scariche e di depolarizzarsi e sembrano rimanere in uno stato polarizzato, congelate ed immobili. Questo effetto si ha nonostante la continuità della perfusione cerebrale e l'assenza di un'ischemia e non è quindi espressione di una sofferenza cellulare: ALM paralizza le cellule nervose e impedisce di scaricare, riduce l'introito di Ca^{2+} nelle cellule e riduce il rilascio di glutammato manifestando quindi un effetto apparentemente protettivo. Tuttavia, in questo esperimento abbiamo provato una sola concentrazione di ALM che era stata pensata proprio al fine di causare una neuroplegia, quello che riscontriamo però è che questa paralisi neuronale e silenzio EEG si protrae ben oltre la fase di arresto di circolo e la sua emivita non è definita. L'analisi dei marker pro ed anti apoptotici non ha fornito dati indicativi in questo senso. Non possiamo al momento conferire ad ALM né un ruolo protettivo né dannoso. Altri studi saranno necessari per definire il corretto dosaggio, la funzione e i tempi di azione e di somministrazione del farmaco.

7.5 CONCLUSIONI

Un' adeguata protezione cerebrale durante i periodi obbligati di arresto di circolo è un tema sempre al centro dell'attenzione di molti ricercatori. Metodiche di perfusione cerebrale per non interrompere o per interrompere per un tempo minimo il flusso cerebrale sono via via sempre più utilizzate, tuttavia assieme a queste metodiche è sempre maggiore la tendenza ad alleviare il grado di ipotermia non utilizzando più un'ipotermia profonda che per molti anni è stato un caposaldo della chirurgia dell'arco aortico. Purtroppo, nonostante gli effetti dannosi di una ipotermia profonda e prolungata siano ben noti, è assai meno noto quale sia la temperatura ottimale da mantenere durante arresto di circolo con perfusione cerebrale per avere una massima protezione cerebrale con i minimi effetti collaterali.

Il nostro studio propone un modello di arresto di circolo e perfusione cerebrale, riproducibile e a basso costo che potrebbe aiutare nella ricerca della temperatura ottimale. In questo studio la perfusione cerebrale si è mostrata efficace nel proteggere il cervello dal danno ipossico-ischemico. Questo rappresenta solo un primo passo nella nostra ricerca, sarà utile infatti confrontare i dati ottenuti con altri diversi gradi di ipotermia. Sarà inoltre necessario indagare gli effetti dei diversi trattamenti del danno da arresto di circolo attraverso l'istologia, l'immunoistochimica, l'immunofluorescenza ed altre tecniche di biologia molecolare e in futuro anche potenziali evocati e studi neuro comportamentali di animali sopravvissuti all'esperimento.

L'effetto dell'aggiunta di ALM alla perfusione cerebrale è ancora da definire, i primi risultati eseguiti su alcuni dei campioni forniti mostrano una maggior attivazione di proteine coinvolte nel danno apoptotico, anche se non in maniera significativa, risulta quindi dubbio anche ciò che viene riscontrato all'EEG; se l'effetto di ALM sia di ibernare il sistema nervoso riducendone l'attività metabolica o se invece abbia un effetto dannoso tale da determinare un silenzio EEG a causa di un importante danno neuronale.

Il risultato delle analisi finali e ulteriori studi, su un numero di soggetti maggiore, e con metodiche alternative a quelle del presente studio, sono necessari per la conferma e corretta determinazione del ruolo di ALM sul sistema nervoso.

8 IPOTERMIA ACCIDENTALE

8.1 SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è l'osservazione della risposta infiammatoria e lo stress ossidativo a seguito delle procedure di riscaldamento lento e rapido in soggetti sottoposti a ipotermia profonda. L'obiettivo in particolare è quello di indagare quale delle due strategie si correli ad un maggior grado di danno tissutale, in particolare cerebrale, e quindi potenzialmente ad esiti negativi sia in termini di sopravvivenza che di funzione. A tale scopo, è stato realizzato un modello sperimentale che si compone di una fase di ipotermia profonda indotta, seguita da una di riscaldamento fino alla normotermia, ottenuto con uno scambiatore di calore connesso al circuito ECMO veno-arterioso. Sono quindi state eseguite valutazioni emodinamiche, analisi di biologia molecolare, analisi istologiche e immunoistochimiche su tessuto cerebrale prelevato al completamento della procedura

8.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI TRATTAMENTO

Tutti i ratti vengono raffreddati fino a 15°C a questa temperatura il ventilatore viene spento e il ratto lasciato per 60 minuti in arresto cardiaco. Durante questa fase il ratto viene collegato al circuito del CPB e dopo 60 minuti inizia la fase di riperfusione e riscaldamento.

In questo esperimento abbiamo voluto verificare l'efficacia di 2 diverse velocità di riscaldamento, sono stati così identificati 2 gruppi.

Nel primo gruppo (n=15) la temperatura finale di 35°C vuole essere raggiunta in 90 minuti e viene quindi riprodotto il metodo usato attualmente nella pratica clinica mantenendo un gradiente tra scambiatore di calore e ratto di circa 10°C e salendo gradualmente fino alla massima temperatura. Questo gruppo è stato denominato gruppo SLOW.

Nel secondo gruppo (n=15) la temperatura del riscaldatore e l'utilizzo della lampada vengono gestite in modo tale da portare la temperatura rettale ai 35°C nell'arco di 40 minuti ponendo la temperatura dello scambiatore di calore inizialmente a 35°C e alzandola gradualmente mantenendo un gradiente termico di 20°C tra acqua nello scambiatore di calore e temperatura corporea del ratto fino alla temperatura massima raggiungibile dallo scambiatore di calore di 45°C. Tale gruppo è stato denominato gruppo FAST. Raggiunta la temperatura desiderata il ratto è stato mantenuto a questa temperatura fino a completare i 90 minuti di riperfusione.

Durante l'esperimento si eseguono dei prelievi arteriosi per la valutazione emogasanalitica prima di iniziare la procedura, quindi al completamento del periodo di arresto cardiaco ipotermico, a metà della fase di riscaldamento e alla conclusione della riperfusione.

Tutti gli animali quindi hanno ricevuto lo stesso tipo di chirurgia, lo stesso tipo di cannulazione e sono stati collegati al circuito del CPB, tutti hanno subito 60 minuti di arresto di circolo e una riperfusione di 90 minuti prima di essere sacrificati.

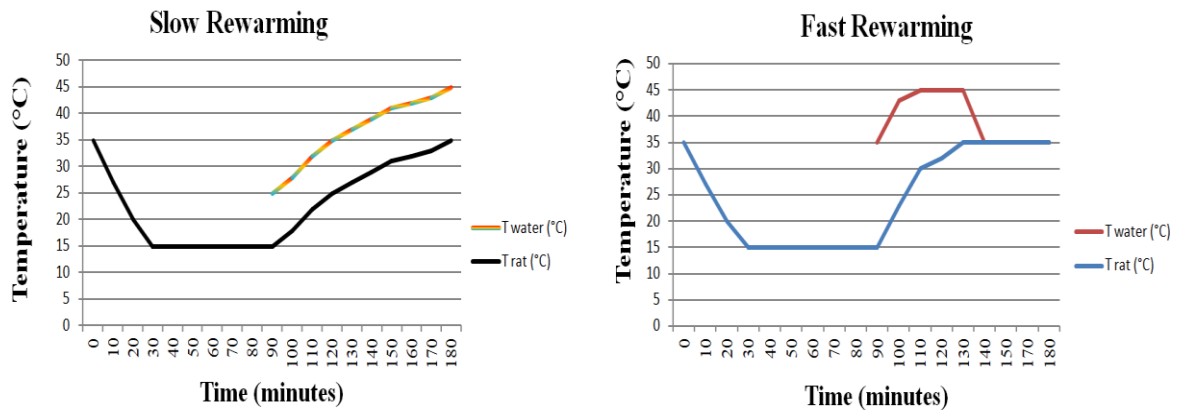


Figura 56: Protocollo di riscaldamento SLOW e FAST.

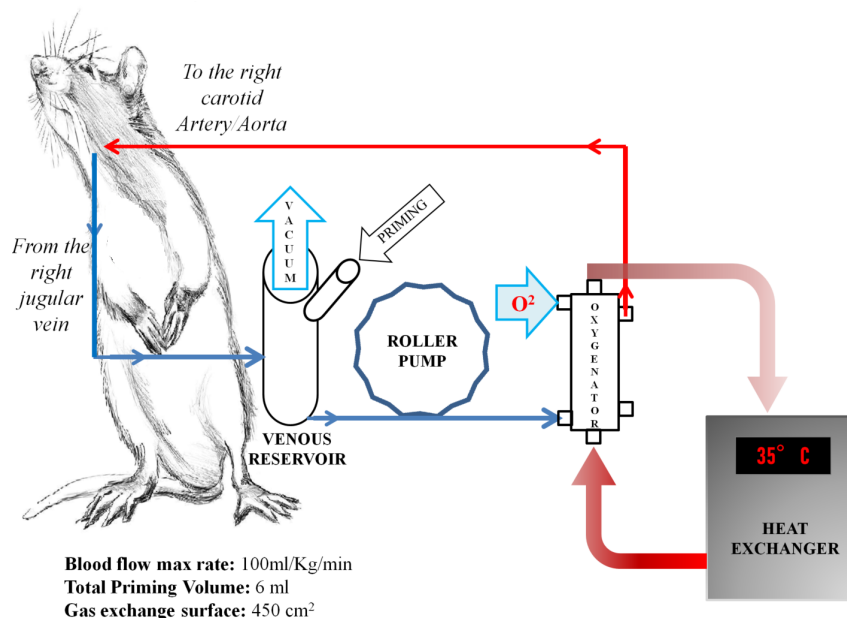


Figura 57: Schema del circuito del CPB. Il ratto è mantenuto a torace chiuso, solo il collo viene inciso per poter introdurre cannula venosa in vena giugulare destra e cannula arteriosa in arteria carotide destra. Dopo l'arresto cardiaco ipotermico (15°C) il ratto viene riperfuso tramite CPB e scaldato attraverso scambiatore di calore collegato al circuito del CPB.

8.3 RISULTATI

EMOGASANALISI

I prelievi arteriosi per la valutazione emogasanalitica sono stati eseguiti prima di iniziare la procedura, al fine di ottenere valori basali, e al raggiungimento dei 15° C; al completamento del periodo di arresto cardiaco ipotermico, a metà della fase di riscaldamento e alla conclusione della stessa. Questi hanno mostrato perlopiù un aumento dei lattati nel corso del riscaldamento, seguito poi da una normalizzazione graduale degli stessi durante la continuazione del CPB. Si verifica un importante aumento dei valori di glicemia e una alterazione delle concentrazioni relative dei gas. Il pH tende a normalizzarsi durante il riscaldamento, dopo lo sviluppo di acidemia nella fase di arresto cardiaco. Anche i valori di potassio subiscono un'alterazione nel corso dell'arresto cardiaco, che però va incontro a normalizzazione mentre il bypass procede. Si verifica, infine, una riduzione graduale della natriemia per tutta la durata dell'esperimento. Non sono state identificate sostanziali differenze tra il gruppo Fast e quello Slow (Tabella VIII).

	Basal	15°C	Cardiac Arrest	45' CPB	90' CPB
pH	7,38±0,04	7,40±0,04	6,97±0,15	7,4±0,03	7,39±0,03
pCO₂ (mmHg)	38±2,5	35±3,2	≥ 115	23±5,3	31±5,2
pO₂ (mmHg)	150±10	160±22	15±5	607±50	213±43
Hct (%)	45±2,5	47,6±2,3	55±3,3	27±2,5	25±2,8
Glu (mg/dL)	155±20	244±42	290±85	≥500	≥500
Na⁺ (mEq/L)	140±3	139±4	142±3	134±4	135±3
K⁺ (mEq/L)	4,0±0,5	4,6±0,5	5,5±0,5	3,8±1	4,1±1
Lat (mmol/L)	0,7±0,2	1,3±0,7	7,2±2,1	8,7±2,2	6,1±1,4

Tabella VIII: Valori emogasanalitici medi riscontrati durante gli esperimenti.

IMMUNOISTOCHEMICA

L'indagine di immunoistochimica è stata eseguita sui campioni di cervelli prelevati e conservati in paraformaldeide 4%. In particolare, è stata indagata l'espressione di indicatori della risposta infiammatoria e del danno ossidativo a livello della regione ippocampale, struttura particolarmente sensibile al danno anossico e ischemico. Gli anticorpi utilizzati nell'ambito della risposta infiammatoria sono stati IL6, ICAM-1, CCL5, TNF α . La loro espressione risulta più marcata nel gruppo *fast*, soprattutto nelle porzioni anteriori dell'area analizzata, sebbene il basso numero di campioni disponibili non permetta di fare una valida indagine statistica (Figure 58,59,60,61). Le sezioni e l'osservazione al microscopio si sono concentrate nell'area CA1 del cervello corrispondente al sistema limbico che viene diviso in due componenti principali: una parte relativa alla corteccia, una profonda, subcorticale. Della parte corticale fanno parte il giro del cingolo, il paraippocampo, l'ippocampo e la corteccia relativa ai nuclei septali. Le aree subcorticali comprendono invece l'amigdala, la formazione reticolare, il nucleo anteriore del talamo, parte dell'ipotalamo e i nuclei abuleni.

Questa area del cervello è l'area più sensibile al danno ipossico ischemico e in cui è più facilmente riscontrabile il danno neurologico.

Per questo studio sono stati utilizzati gli anticorpi primari elencati di seguito.

TNF α antibody (Novus Biologicals, NB-600-587). Il TNF α è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica e membro del gruppo di proteine che mediano la risposta di fase acuta. È prodotta principalmente da macrofagi, e in minor parte dalle altre cellule del sistema immunitarie, ed è in grado di stimolare la produzione di altre citochine infiammatorie quali IL-6 e IL-1.

IL-6 antibody (Novus Biologicals, NB600-1131). La IL-6 è una delle citochine prodotte a seguito di stimoli infiammatori ed è un mediatore importante delle risposte di fase acuta, è quindi un buon indicatore della risposta infiammatoria che si sviluppa nei tessuti.

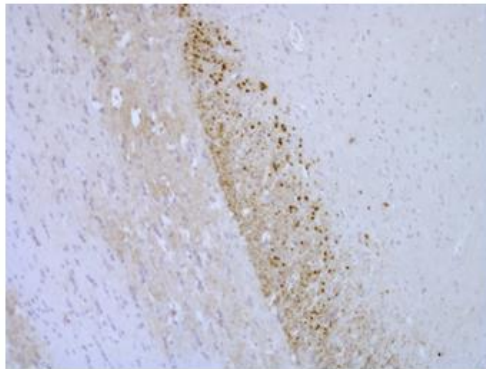
CCL5 antibody (Bioss Antibodies, bs-1324R). La CCL5 è una citochina chemotattica, o chemochina, che gioca un ruolo attivo nei siti infiammatori richiamando cellule T, eosinofili e basofili, con l'aiuto di particolari citochine, quali IL-2 e IFN- γ , è inoltre coinvolta nell'induzione della proliferazione e dell'attivazione di cellule natural-killer.

ICAM-1 antibody (Bioss Antibodies, bs-0608R). ICAM-1 è una glicoproteina espressa sulla superficie delle cellule endoteliali e dei leucociti che funge da molecola di adesione, favorendo la migrazione leucocitaria attraverso l'endotelio. La sua espressione è regolata da citochine pro-infiammatorie come TNF α e IL-1.

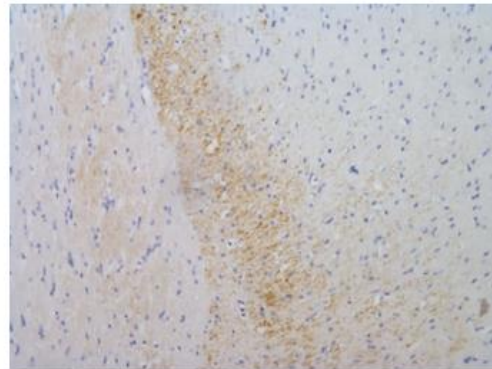
Malonildialdehyde antibody (Abcam, ab6463). La malonildialdeide (MDA) è un prodotto della perossidazione degli acidi grassi che ha luogo in tutte le cellule dei mammiferi. La MDA è un radicale libero che va a reagire con svariate molecole, tra cui proteine, lipoproteine e DNA, e risulta implicata in processi quali l'invecchiamento, la carcinogenesi e la mutagenesi.

Nitrotirosina antibody (Bioss Antibodies, bs-8551R). La nitrotirosina è un prodotto della nitrificazione della tirosina, mediata da specie azotate reattive come l'anione perossinitrito e il diossido di azoto. La nitrotirosina è un indicatore o marker di danno cellulare, infiammazione e produzione di NO, quindi di danno ossidativo tissutale.

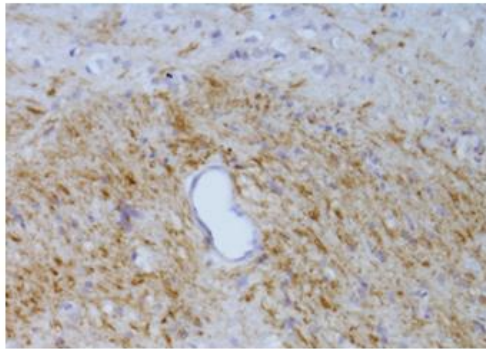
TNF α , FAST, parte anteriore



TNF α , SLOW, parte anteriore



TNF α , FAST, parte posteriore



TNF α , SLOW, parte posteriore

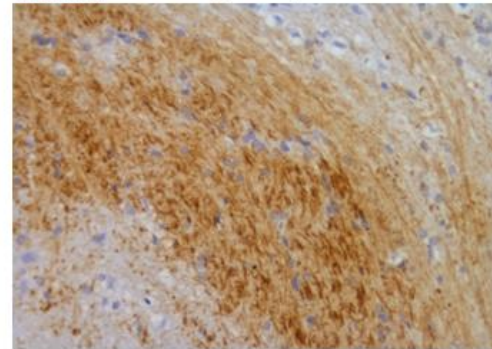


Figura 58: *Espressione di TNF α nei gruppi SLOW e FAST nelle parti anteriore e posteriore di CA1.*

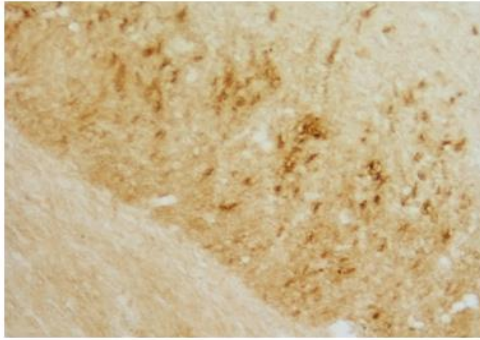
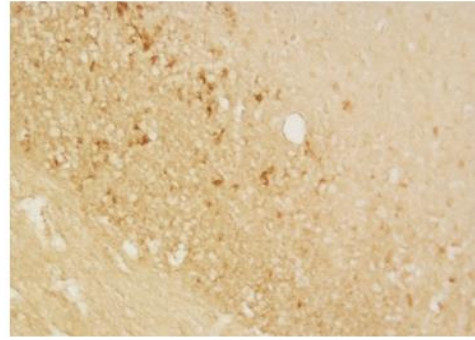
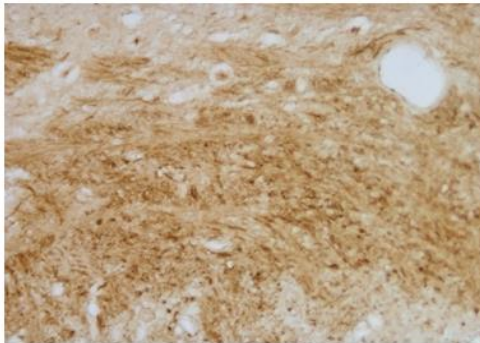
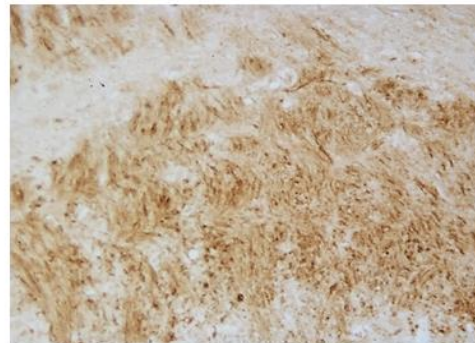
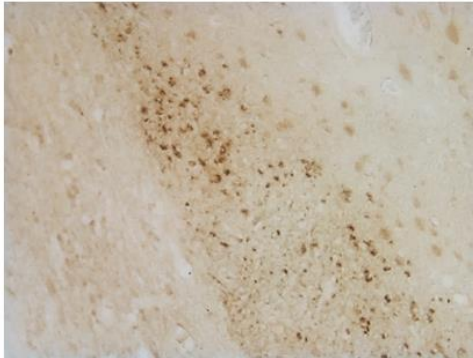
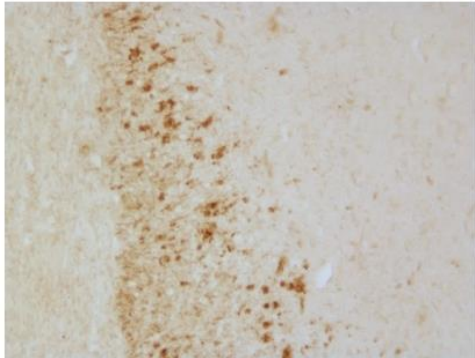
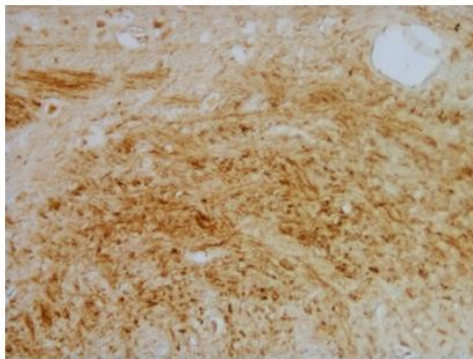
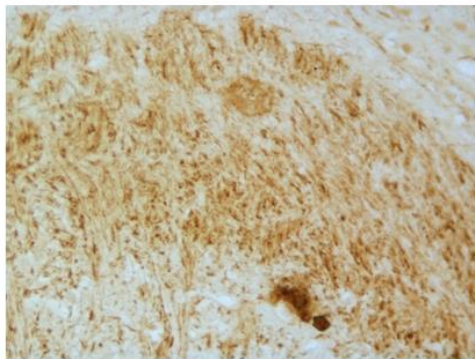
IL6, FAST, parte anteriore**IL6, SLOW, parte anteriore****IL6, FAST, parte posteriore****IL6, SLOW, parte posteriore****CCL5, FAST, parte anteriore****CCL5, SLOW, parte anteriore****CCL5, FAST, parte posteriore****CCL5, SLOW, parte posteriore**

Figura 59 e 60: *Espressione di IL-6 e CCL5 nei gruppi SLOW e FAST nelle parti anteriore e posteriore di CA1.*

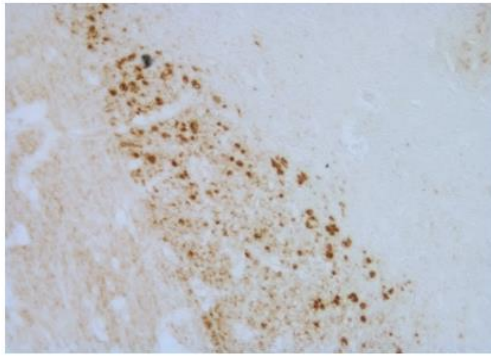
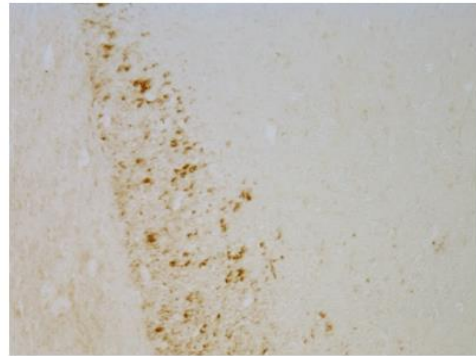
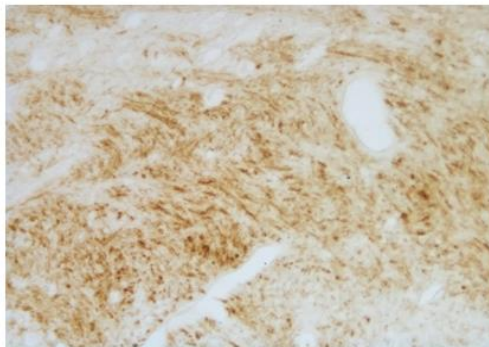
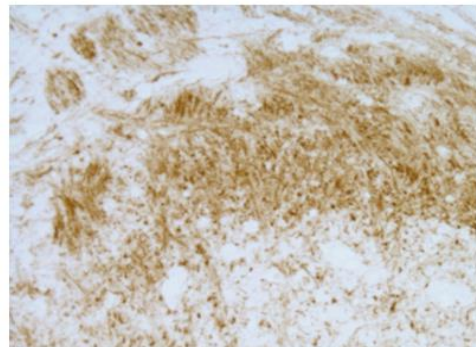
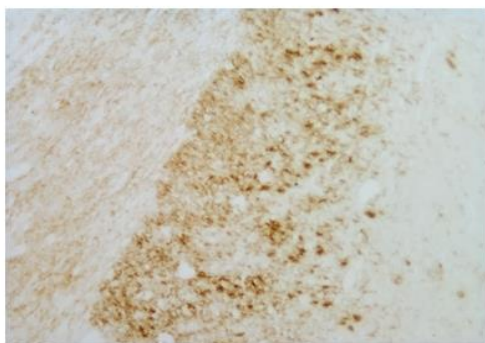
ICAM-1, FAST, parte anteriore**ICAM-1, SLOW, parte anteriore****ICAM-1, FAST, parte posteriore****ICAM-1, SLOW, parte posteriore**

Figura 61: *Espressione di ICAM-1 nei gruppi SLOW e FAST nelle parti anteriore e posteriore di CA1*

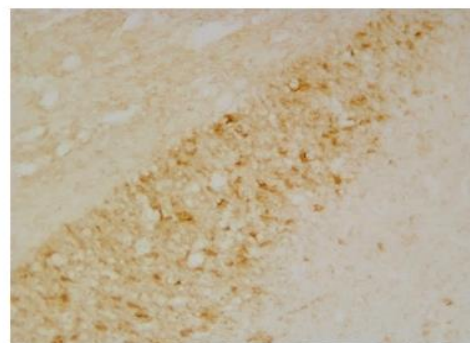
Dalle indagini effettuate sui primi campioni (3 per gruppo) la reazione degli anticorpi sembra più marcata nei ratti trattati con riscaldamento veloce indicando una maggior risposta infiammatoria in questo gruppo.

Per quanto riguarda lo stress ossidativo cellulare, invece, gli anticorpi impiegati sono stati la malonildialdeide e la nitrotirosina. La positività nei campioni prelevati nel gruppo sottoposto a riscaldamento rapido risulta più marcato, indicando un maggior grado di stress ossidativo in questo gruppo (Figura 62 e 63).

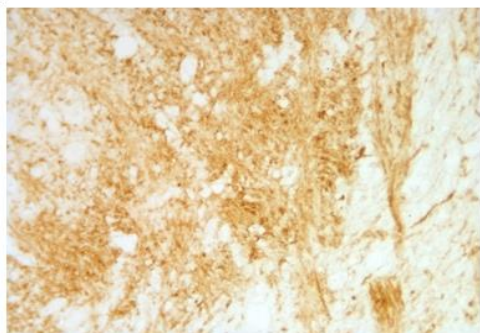
Malonildialdeide, FAST, parte anteriore



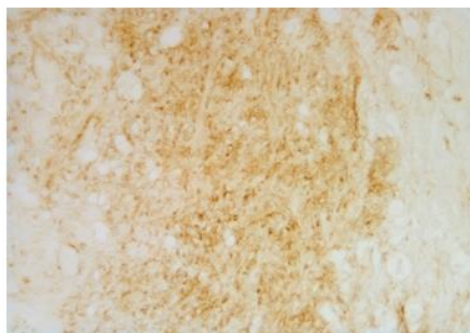
Malonildialdeide, SLOW, parte anteriore



Malonildialdeide, FAST, parte posteriore



Malonildialdeide, SLOW, parte posteriore



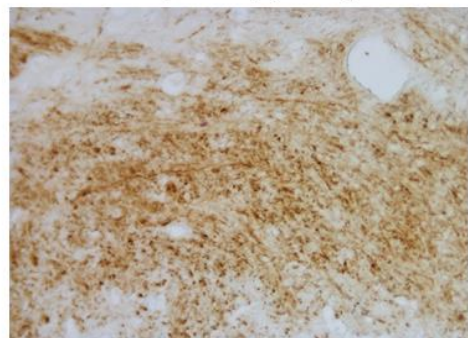
Nitrotirosina, FAST, parte anteriore



Nitrotirosina, SLOW, parte anteriore



Nitrotirosina, FAST, parte posteriore



Nitrotirosina, SLOW, parte posteriore

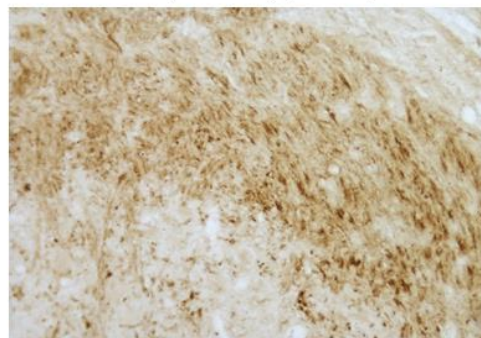


Figura 62 e 63: *Espressione di Malondialdeide e Nitrotirosina nei gruppi SLOW e FAST nelle parti anteriore e posteriore di CA1*

IMMUNOFLUORESCENZA

Le indagini di immunofluorescenza sono state eseguite sui campioni di cervelli prelevati e conservati in paraformaldeide 4%. Nella fattispecie è stata valutata l'espressione di Iba1 in determinate aree cerebrali. Iba1 è una proteina cellulare espressa tipicamente dalle cellule della microglia. La sua espressione aumenta in associazione a stati infiammatori, e permette quindi di discriminare tra la microglia presente nel tessuto cerebrale a scopo di sorveglianza e quella invece attivata. Le aree cerebrali indagate sono state la corteccia cerebrale, la zona subventricolare, area ricca di cellule staminali neuronali adulte, e l'ippocampo, che è invece particolarmente suscettibile al danno ischemico ed anossico (Figura 64-66).

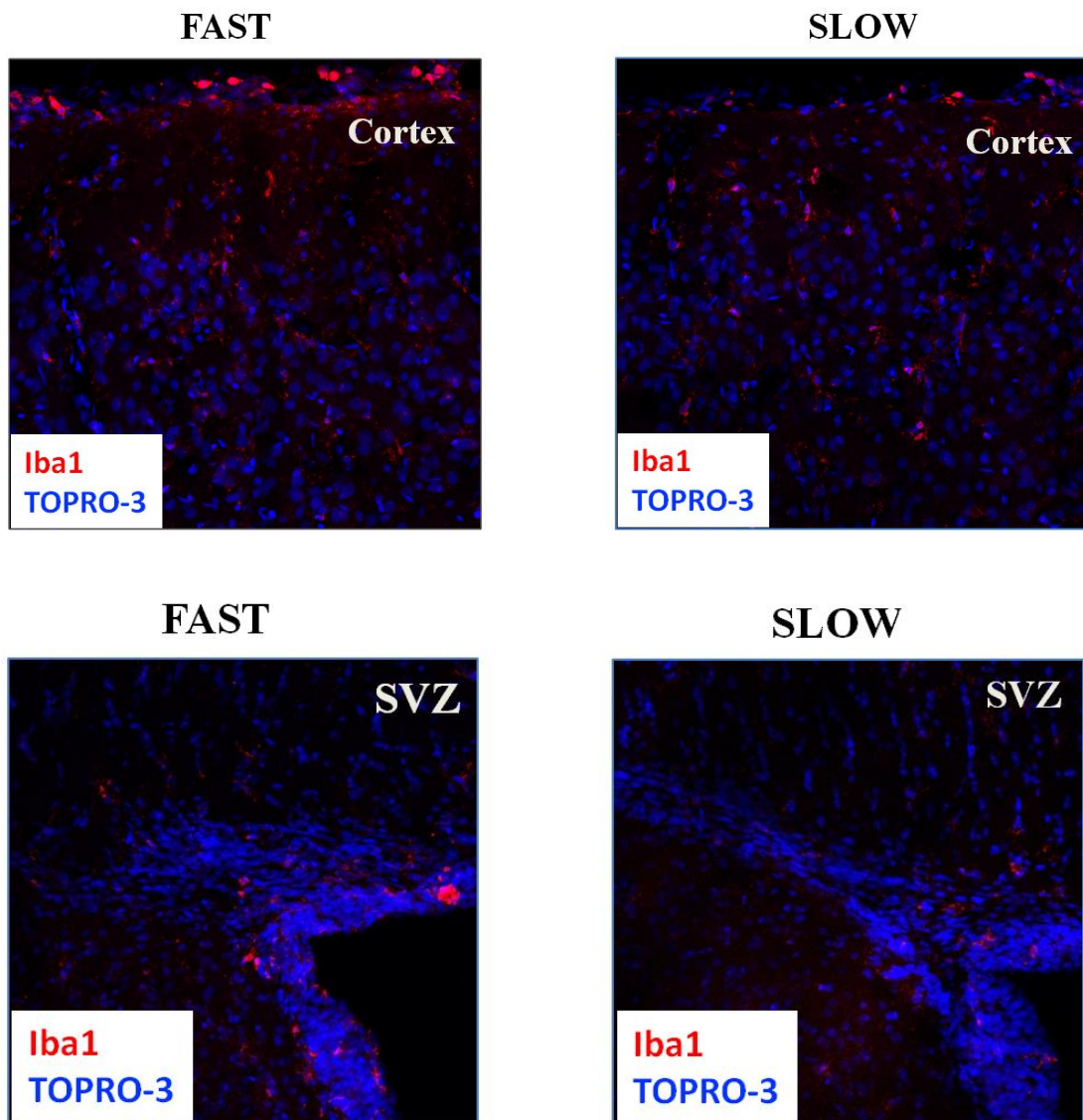


Figura 64 e 65: Confronto dell'espressione di Iba1 a livello corticale e subcorticale (SVZ) dell'area CA1 tra il gruppo sottoposto al riscaldamento rapido (FAST) rispetto a quello sottoposto a riscaldamento lento (SLOW). Iba1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1; TOPRO-3: carbocyanine monomer nucleic acid stain.

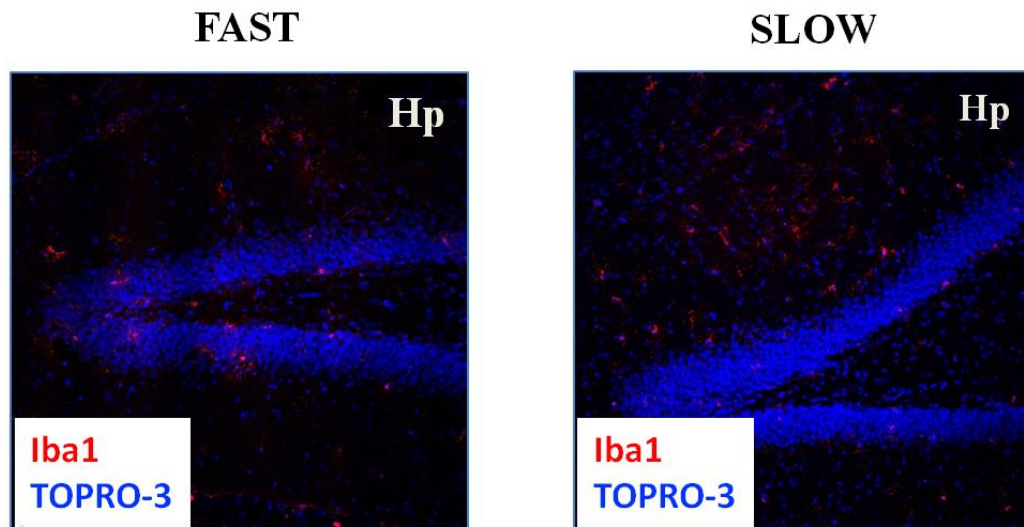


Figura 66: Confronto dell'espressione di *Iba1* a livello dell'ippocampo tra gruppo sottoposto al riscaldamento rapido (FAST) rispetto a quello sottoposto a riscaldamento lento (SLOW). *Iba1*: Ionized calcium binding adaptor molecule 1; TOPRO-3: carbocyanine monomer nucleic acid stain.

I campioni prelevati nel gruppo sottoposto a riscaldamento rapido mostrano un'espressione lievemente maggiore della proteina indagata, tuttavia le analisi non hanno evidenziato un aumento più marcato rispetto al gruppo sottoposto a riscaldamento lento. Essendo, tuttavia, il trend quello di mostrare una più spiccata espressione della proteina nei ratti *fast*, è probabile che eseguendo un maggior numero di esperimenti il dato assuma un valore statisticamente significativo (Figura 67).

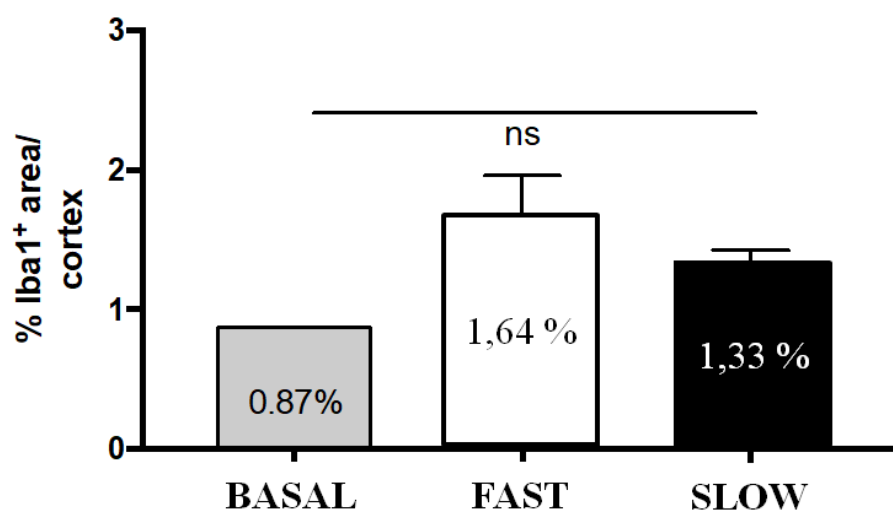


Figura 67: Espressione percentuale di *Iba1* per area di corteccia nei diversi gruppi. *Iba1*: Ionized calcium binding adaptor molecule 1.

WET/DRY RATIO

In un piccolo campione di ratti abbiamo prelevato i cervelli a fresco in ordine di ottenere la wet/dry ratio. I cervelli vengono prelevati interi e pesati immediatamente per ottenere il peso iniziale (wet). In seguito, i cervelli venivano posti in un forno da laboratorio con una temperatura costante di 105°C per permettere una lenta vaporizzazione dell'acqua presente nel tessuto cerebrale. Dopo 24 ore, i cervelli venivano nuovamente pesati (dry) e il confronto tra i 2 pesi forniva la wet/dry ratio indice di edema tissutale. Tuttavia, non sono state riscontrate differenze significative ma una tendenza in minor edema nel gruppo Slow.

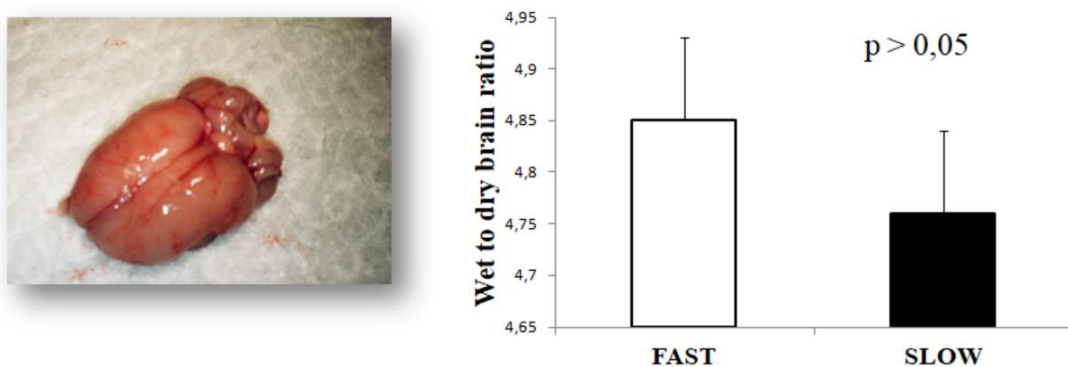


Figura 68: Wet/dry ratio gruppi SLOW e FAST.

PRESSIONE DI PERFUSIONE CEREBRALE

La pressione di perfusione cerebrale è calcolata sottraendo alla pressione arteriosa media la pressione intracranica. Questa è stata ottenuta inserendo il catetere di Millar nel parenchima cerebrale ad una profondità di 3 mm sotto il tavolo cranico interno dell'osso parietale. Non si sono riscontrate differenze significative tra i due gruppi.

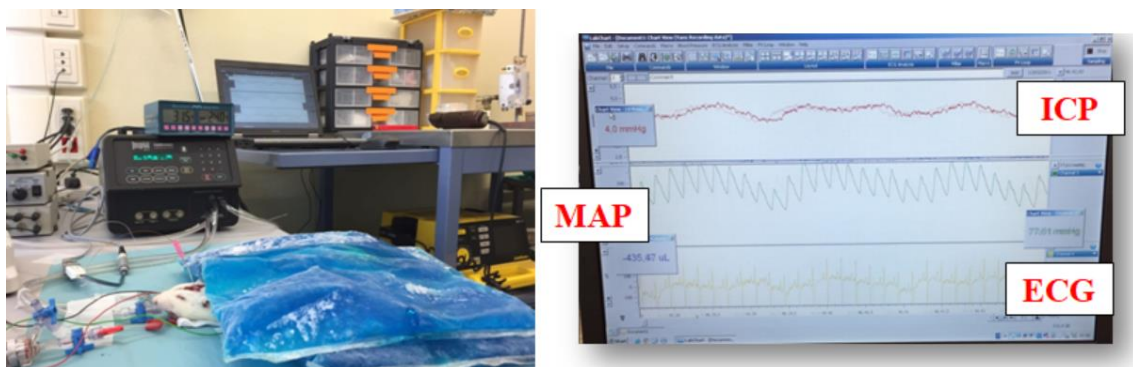


Figura 69: Misurazione della pressione intracranica. MAP: pressione arteriosa media; ICP: pressione intracranica; ECG: elettrocardiogramma.

RISONANZA MAGNETICA

Alcuni ratti sono stati fatti sopravvivere per poter essere sottoposti alle indagini di risonanza magnetica, eseguiti 2 e 24 ore dopo la fine dell'esperimento. Nella fattispecie sono state eseguite una prima valutazione con mezzo di contrasto per poter valutare il grado di perfusione cerebrale, e in particolare dei gangli basali, e successivamente si è calcolata la diffusività media (*mean diffusivity*, MD) della stessa area, quale indicatore del grado di edema cerebrale.

Il gradiente di perfusione cerebrale è stato misurato tramite la valutazione delle immagini acquisite prima e dopo la somministrazione di contrasto, impiegando la formula $[(\text{post-pre})/\text{pre}]$. Mentre a distanza di 2 ore i valori sono simili a quelli basali per entrambi i gruppi a 24 ore si ha una riduzione della perfusione cerebrale nel gruppo FAST, suggerendo che eventuali conseguenze negative della procedura impieghino più tempo per svilupparsi (Figura 70).

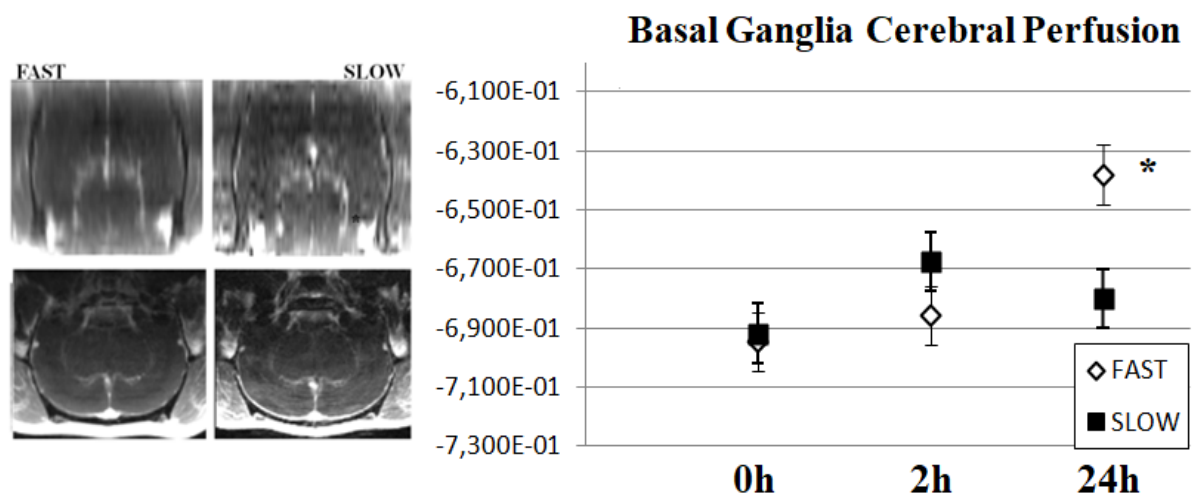


Figura 70: Confronto della perfusione cerebrale a 2 h e a 24 h tra il gruppo sottoposto a riscaldamento rapido e quello sottoposto a riscaldamento lento. La differenza tra i gruppi risulta statisticamente significativa solo nelle immagini acquisite a distanza di 24 ore

La seconda indagine riguardava la diffusività media, eseguita sempre a 2 e 24 ore. Il tensore di diffusione è un parametro della risonanza magnetica che sfrutta il peculiare comportamento delle molecole d'acqua a livello delle fibre nervose. Normalmente, infatti, queste molecole sono dotate di cosiddetta isotropia, cioè tendono a muoversi con eguale probabilità in ciascuna direzione dello spazio. La tipica struttura delle fibre nervose, però, fa sì che queste molecole siano spinte a muoversi principalmente in una determinata direzione, acquisendo in questo caso l'anisotropia, che viene per l'appunto sfruttata in risonanza magnetica per la creazione di immagini tridimensionali che riproducono la disposizione delle fibre stesse. Nel caso particolare, la diffusività media viene applicata nel contesto del meccanismo visto per la generazione del tensore di diffusione per stabilire il grado di motricità indipendente delle molecole nel contesto di un voxel, unità di misura del volume, ossia controparte tridimensionale del pixel. In sostanza ciò rende idea della quantità di molecole d'acqua presente nel tessuto analizzata, oltre che della loro libertà di movimento, riflettendo in termini clinici il grado di edema cerebrale. Come per il precedente, l'analisi ha evidenziato valori migliori per i ratti sottoposti a trattamento lento, con edema cerebrale meno marcato. Anche in questo caso, tuttavia, le differenze assumevano valori significativi solo a distanza di 24 ore. (Figura 71)

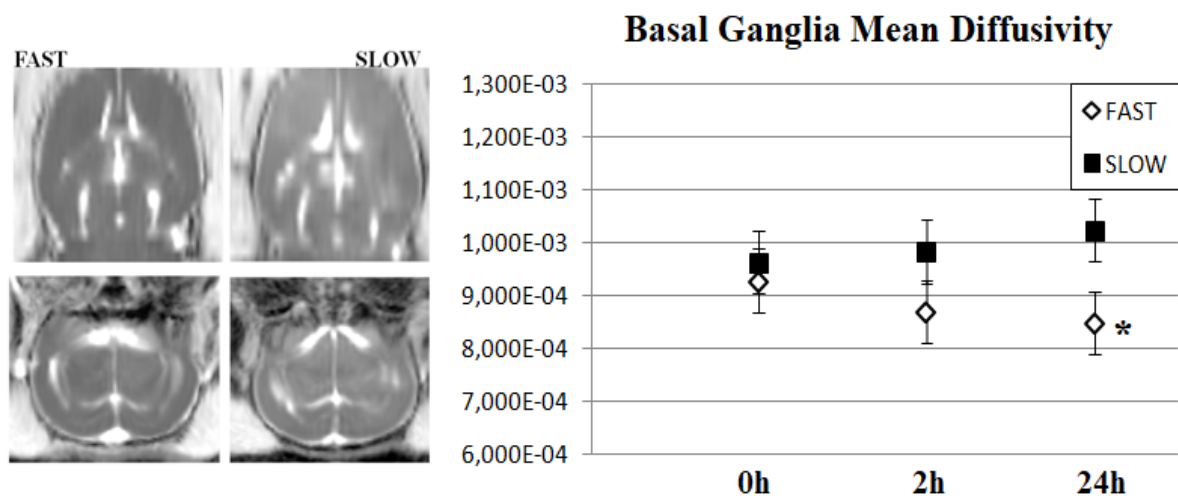


Figura 71: Confronto della mean diffusivity a 2 h e a 24 h tra il gruppo sottoposto a riscaldamento rapido e quello sottoposto a riscaldamento lento. La differenza tra i gruppi risulta statisticamente significativa solo nelle immagini acquisite a distanza di 24 ore

8.4 DISCUSSIONE

L'arresto di circolo ipotermico in chirurgia cardiaca è tutt'oggi una tecnica diffusamente utilizzata negli interventi chirurgici a carico dell'arco aortico, quale metodica di protezione neurologica in corso di arresto cardiaco. Dopo la scoperta di Bigelow, risalente al 1950, sul ruolo protettivo dato dalle basse temperature, la sua applicazione si è diffusa sempre di più, passando dall'associazione con il CPB, sempre in contesto chirurgico, introdotta da Barnard e Shrire nel 1963, sino a diventare un presidio terapeutico nella medicina d'urgenza, come strategia di intervento in pazienti in arresto cardiaco o in coma post-ROSC. D'altra parte, l'ipotermia è tutt'altro che una condizione fisiologica per l'organismo, e come tale si associa ad una serie di problematiche che possono ridurre gli effetti benefici garantiti dalla tecnica in questione. L'ipotermia, infatti, altera la clearance dei farmaci, determina vasocostrizione, piastrinopatia, aritmie, disfunzione dei tubuli renali, aumentato rischio di infezioni ecc., e per questa ragione negli ultimi anni, soprattutto grazie alle tecniche di perfusione cerebrale selettiva e non, viene sempre più spesso impiegata un'ipotermia moderata, piuttosto che profonda, associata alla perfusione cerebrale proprio per garantire un rapporto rischio/beneficio quanto più possibile ottimale. Limitandosi a temperature meno estreme si vanno a ridurre gli effetti avversi causati dall'ipotermia, non solo per il grado di profondità di alterazione dell'omeostasi che viene raggiunto ma anche per la riduzione dei tempi di raffreddamento e di riscaldamento, diminuendo quindi sia la durata dell'arresto cardiaco che quella del CPB e conseguentemente la durata totale dell'intervento chirurgico. Nonostante l'enorme quantità di studi dedicata a questo argomento, ancora oggi non esiste un accordo generale su quale sia la migliore tecnica di perfusione cerebrale, sulle temperature ideali da raggiungere durante la procedura, sul tempo limite della fase di arresto circolatorio, oltre che sulle modalità e tempistiche della successiva fase di riscaldamento.²³⁸ Sostanzialmente, tutti gli studi sono ancora gravati da un importante tasso di esiti neurologici, per cui risulta fondamentale approfondire e sviluppare ulteriormente l'argomento, al fine di trovare un approccio globale e standardizzato che garantisca performance migliori.

In contrapposizione all'ipotermia che viene indotta per fini terapeutici troviamo quella che occorre in maniera accidentale. L'ipotermia accidentale può essere primitiva, se si verifica in soggetti precedentemente sani per incidenti in alta montagna, annegamento o congelamento in setting urbano, o secondaria, quale complicanza di patologie croniche preesistenti. Questi pazienti necessitano di procedure che permettano di ristabilire la normotermia, tuttavia, anche in questo contesto non esistono linee guida stabilite e riconosciute in tutti i centri su quale

debba essere il protocollo più adeguato da applicare. Un soggetto che resta in ipotermia per tempi prolungati va incontro ad arresto cardiaco, e necessita di essere sottoposto al trattamento con ECMO, sia allo scopo di fornire il supporto ventilatorio ed emodinamico ai fini della sopravvivenza, sia per essere opportunamente riscaldato. Il rapido raggiungimento della normotermia, soprattutto in soggetti traumatizzati, ha anche lo scopo di accelerare il recupero dal trauma stesso, ridurre le problematiche legate al sanguinamento e alle infezioni. Anche in questo contesto risulta fondamentale stabilire in maniera più accurata possibile il protocollo cui sottoporre i pazienti, in termini di gradiente di temperatura tra quella del paziente e lo scambiatore di calore, flussi nel circuito della circolazione extracorporea e velocità di riscaldamento.

Il ruolo della temperatura nell'ambito del bypass cardiopolmonare come determinante di esiti neurologici venne dimostrata da Martin et al in uno studio del 1994, effettuato su 1.001 pazienti sottoposti a CPB ad una temperatura $\geq 35^{\circ}\text{C}$ (n=493) o $\leq 28^{\circ}\text{C}$ (n=508).²³⁹ I risultati dimostrarono un'incidenza di morbidità neurologica tre volte maggiore nel gruppo "caldo".

A questo seguirono numerosi studi, i cui risultati variavano dalla conferma di queste prime osservazioni, alla dimostrazione dell'assenza di una sostanziale differenza tra gli esiti neurologici a seconda della temperatura impiegata, fino addirittura a contare un'incidenza lievemente superiore di ictus in pazienti sottoposti a temperature più basse. Questo ha portato a considerare come fattori determinanti anche la velocità di riscaldamento e la temperatura postoperatoria. Quest'ultima in particolare eserciterebbe il proprio effetto deleterio favorendo l'espansione della zona di penombra, area di tessuto ischemico potenzialmente vitale, estremamente sensibile ad insulti secondari, la cui evoluzione correla fortemente con l'outcome neurologico.^{240,241} Grocott et al. ipotizzarono che l'ipertermia cerebrale postoperatoria potesse essere un determinante della disfunzione cognitiva.²⁴² L'ipertermia cerebrale è, infatti, una causa prevalente e sottostimata di lesione neurologica nel corso di chirurgia dell'arco aortico, al punto che si stima essere responsabile del 50-80% delle disfunzioni neuropsicologiche che si manifestano a seguito dell'intervento.²⁴³ I meccanismi sottostanti includono l'esacerbazione del danno ischemico, l'aumentata riduzione dei radicali dell'ossigeno, il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori a livelli tossici, l'inappropriato ristabilimento del metabolismo energetico e l'aumentata inibizione delle protein chinasi.

Sono essenzialmente due gli approcci che possono essere impiegati per cercare di ridurre l'incidenza di ipertermia post-riscaldamento. Il primo consiste nel limitare il target di temperatura che si vuole raggiungere. La principale problematica associata al management di

questa variabile consiste, tuttavia, nella difficoltà ad identificare un sito a livello del quale effettuare una sua misurazione che correli in maniera affidabile con la temperatura presente a livello cerebrale. Stone et al identificarono l'arteria polmonare come il sito più accurato, mentre il nasofaringe, pur essendo un buon indicatore durante la fase di raffreddamento, tende a sottostimare la temperatura cerebrale fino a 4° C durante il riscaldamento.²⁴⁴ Tuttavia, spesso la misurazione a livello polmonare è un approccio eccessivamente invasivo, e di difficile applicazione nella pratica clinica, è quindi comunque preferibile prediligere siti più facilmente accessibili, quale appunto il nasofaringe. Si potrebbe in tal caso suggerire di interrompere il riscaldamento una volta raggiunta una temperatura nasofaringea di 34-35° C per prevenire l'insorgenza di ipertermia a livello centrale.

Il secondo approccio consiste nel ridurre la velocità di riscaldamento, diminuendo la differenza di temperatura tra quella del sangue e quella a cui è riscaldata l'acqua nello scambiatore di calore del CPB. Riscaldare il paziente troppo velocemente, aumentando la temperatura dello scambiatore a $\geq 39^{\circ}$ C determina infatti la comparsa di ipertermia cerebrale. Peraltro, il riscaldamento rapido nei ratti, pur avendo cura di evitare strettamente la comparsa di ipertermia, ha mostrato di aumentare il danno istologico e soprattutto l'infiammazione cerebrale, con aumentata infiltrazione di eosinofili e di espressione di NF-kB, rispetto a quanto avviene nel riscaldamento lento.²⁴⁵ Un effetto ben conosciuto del riscaldamento rapido è quello di determinare un mismatch tra l'apporto di ossigeno cerebrale e la sua domanda. Si verifica infatti un temporaneo sbilancio tra il consumo metabolico di ossigeno cerebrale e il flusso ematico, determinando di conseguenza una desaturazione a livello giugulare.²⁴⁶ Altri effetti noti del riscaldamento rapido sono la distruzione dell'omeostasi idrica cerebrale (identificata da una aumentata concentrazione di acquaporina4), e di conseguenza lo sviluppo di edema cerebrale, ed il danno assonale. Al contrario, la superiorità del riscaldamento lento può essere testimoniata da un meno pronunciato incremento di acquaporina, dalla preservazione della risposta vascolare arteriolare nei vasi piali e dell'accoppiamento metabolico, oltre che dal sostenuto effetto antinfiammatorio.²⁴⁷ Inoltre, nello studio di Grigore viene esaminato l'effetto della velocità del riscaldamento sugli esiti neurocognitivi. I risultati non mostrarono una sostanziale differenza in funzione della rapidità di riscaldamento, tuttavia gli autori notarono che un riscaldamento lento era associato a miglioramenti più marcati della performance cognitiva a distanza di 6 settimane rispetto a quelli riscaldati in modo convenzionale.²⁴⁸

Anche i risultati delle nostre analisi mostrano in linea generale risultati migliori nel gruppo sottoposto a riscaldamento lento. Nel caso dello sviluppo di edema cerebrale e della

valutazione della perfusione cerebrale, indagati tramite risonanza magnetica, bisogna sottolineare che risultati rilevanti venivano ottenuti solo a 24 ore di distanza dalla procedura, suggerendo che molte delle complicanze che si possono sviluppare in seguito a riscaldamento rapido richiedano più tempo per instaurarsi. Le particolari caratteristiche anatomiche del cervello lo rendono un tessuto immunologicamente privilegiato, più difficilmente accessibile alle cellule del sistema immunitario per via della particolare struttura delle giunzioni strette che compongono la barriera ematoencefalica. Ciò, pertanto, spiegherebbe come sia necessario più tempo perché si inneschino e si concretizzino, in termini sia istologici che radiografici, i meccanismi che portano al richiamo dei leucociti, al rilascio di mediatori infiammatori amplificatori della risposta stessa, all'induzione dell'apoptosi cellulare e alla necrosi del tessuto nervoso coinvolto nel danno ipossico. Questo fenomeno può facilmente essere riscontrato, ad esempio, nella valutazione tomografica dell'ictus ischemico, la quale risulta sostanzialmente negativa se eseguita in fase acuta, mentre si assiste ad una graduale estrinsecazione del danno nelle 24 ore successive all'episodio ictale. Di conseguenza, è probabile che la modalità di raccolta dei campioni, che prevedeva il prelievo dei tessuti immediatamente dopo la fine della procedura, non garantisca una ottimale valutazione di tutti i parametri che sono stati indagati. Anche per quanto riguarda le indagini di immunoistochimica circa la risposta infiammatoria e il danno ossidativo cerebrale, pur suggerendo uno sviluppo lievemente più marcato nel gruppo *fast*, la differenza tra i gruppi non è omogenea né in termini di marcatore utilizzato, né e soprattutto in termini di area cerebrale indagata. Infatti, mentre è possibile riconoscere con una certa chiarezza la maggior positività nelle porzioni ippocampali anteriori dei ratti sottoposti a riscaldamento rapido, molto meno evidente è la differenza tra i gruppi quando ad essere indagate sono le porzioni dorsali.

Un discorso analogo può essere fatto nel caso dell'indagine di immunofluorescenza, che andava a valutare il grado di attivazione della microglia nelle aree corticali, subventricolare e ippocampale tramite l'individuazione dell'espressione di Iba1. L'analisi statistica non ha permesso di ottenere una differenza tra i gruppi che potesse essere considerata significativa. In particolare, l'applicazione di un modello con CPB a torace chiuso permette di ridurre il trauma chirurgico, di ridurre il sanguinamento, ridurre l'emodiluizione e di aumentare le possibilità di sopravvivenza dell'animale per cui rispetto al vecchio modello a torace aperto con cui sono stati eseguiti i primi esperimenti sarà sicuramente più facile ottenere dati a 24 ore. Tuttavia, questi esperimenti non sono stati al momento eseguiti a causa della temporanea impossibilità di utilizzo della Risonanza Magnetica a causa di lavori di ristrutturazione. Per

cui, seppure sarebbe già possibile ottenere campioni istologici a 24 ore, gli esperimenti non sono stati eseguiti perché ciò causerebbe uno spreco e un sacrificio di ulteriori animali dato che sugli stessi animali è possibile effettuare Risonanza Magnetica e prelevare cervello in PFA per esami di immunoistochimica ed immunofluorescenza.

Oltre a questi campioni posti in PFA sono stati prelevati dei campioni e congelati in azoto liquido e mantenuti nel freezer -80°C, su questi campioni verranno effettuate possibilmente analisi di marker pro-infiammatori come già effettuato in altri studi.

Sotto certi aspetti, un dato che può essere potenzialmente estrapolato è che non è possibile confermare con assoluta certezza la superiorità del protocollo lento rispetto a quello rapido. Sebbene il riscaldamento lento garantisca il vantaggio di evitare il riscaldamento eccessivo, d'altra parte implica un aumento della durata del CPB e del rischio di ipotermia postoperatoria, che si verifica tipicamente nelle prime ore dopo lo svezzamento dal CPB, il quale è in genere accompagnato da un calo della temperatura di almeno 0,5° C (*after-drop*). Il vantaggio dell'applicare un protocollo di più rapida esecuzione è sostanzialmente quello di ridurre il periodo in cui il paziente risulta sottoposto al CPB. Clinicamente ciò si traduce in minor rischio di sanguinamento legato all'eparinizzazione, minor durata dell'anestesia, ridotta attivazione della risposta infiammatoria che si verifica all'interno del circuito del CPB, minore necessità di ricorrere alla trasfusione di emoderivati, con tutte le problematiche ad essa associata, ridotta incidenza di infezioni perioperatorie, minor rischio di insorgenza di fenomeni embolici e infine ridotto leakage capillare e comparsa di edema tissutale che rende difficoltoso lo svezzamento dalla macchina. Considerato l'alto numero di evidenze a favore del trattamento lento, tuttavia, risulta improbabile che il solo vantaggio di ridurre i tempi di CPB sia sufficiente a rendere migliore l'approccio rapido.

Ad ogni modo, fino ad oggi la letteratura relativa ai protocolli di arresto cardiaco ipotermico si sono concentrati in maniera molto più marcata su altri aspetti della procedura, tralasciando nella maggior parte dei casi di eseguire una valutazione sistematica, struttura e su ampia scala, che riguardasse la fase successiva all'arresto cardiocircolatorio, e nella fattispecie le modalità di riscaldamento e il management post-procedurale. Ulteriori indagini necessitano di essere eseguite al fine di stabilire un protocollo universale, che possa essere applicato in tutti i centri e che permetta di ottenere risultati sempre più promettenti.

8.5 CONCLUSIONI

L'applicazione clinica dell'ipotermia, quale presidio chirurgico per consentire di ottenere un arresto circolatorio relativamente sicuro, rimane una tecnica ampiamente diffusa in chirurgia cardiaca. Gli enormi vantaggi che la tecnica fornisce la rendono sostanzialmente insostituibile, e difficilmente è possibile sperare di ottenere lo stesso grado di protezione mediante l'utilizzo di altre strategie. Ciononostante, questa metodica è ancora oggi gravata da un certo tasso di complicanze neurologiche, che richiedono di conseguenza un ulteriore approfondimento degli studi in materia al fine di ottenere un protocollo quanto più possibile scevro da esiti negativi per il paziente.

L'aspetto peculiare su cui si concentra questo studio è la fase di riscaldamento successiva all'arresto di circolo, e nella fattispecie la velocità con cui è più opportuno riportare a normotermia il soggetto sottoposto alla procedura. Lo stesso protocollo, peraltro, potrebbe trovare un'applicazione nell'ambito dell'intervento di riscaldamento in soggetto andati incontro ad ipotermia accidentale. Come già riscontrato in letteratura, il modello di riscaldamento lento sembra confermare la strategia più promettente, evidenziando un minor grado di risposta infiammatoria e danno ossidativo a livello cerebrale e un minor sviluppo di edema cerebrale.

Non tutte le indagini hanno consentito di definire risultati statisticamente validi, siamo attualmente in attesa dell'analisi dei campioni prelevati e posti in freezer -80°C e ulteriori analisi dei cervelli in PFA già prelevati ed in attesa di essere analizzati. Si spera che questi risultati confermino quanto già visto e forniscano abbastanza dati da rendere significativi i risultati ottenuti.

Risulta pertanto necessario prolungare ulteriormente lo studio, implementando il numero di campioni raccolti ed eseguendo analisi aggiuntive e che possano, in tal modo, risultare maggiormente accurate.

9. CONCLUSIONI FINALI E CONSIDERAZIONI PERSONALI

Questa tesi è frutto del lavoro di molti anni, non solo degli ultimi 3 anni passati nel corso di Dottorato di Scienze Cardiovascolari, alcuni progetti infatti erano già attivi all'inizio del periodo del dottorato e poiché già in corso e con risultati che son arrivati mentre già ero entrato nel corso di dottorato sono stati qui riportati.

Mentre negli anni precedenti al corso di dottorato il frutto delle analisi del laboratorio di ricerca cardiovascolare erano state focalizzate sugli effetti miocardici la ricerca nel campo neurologico è stata iniziata durante l'ultimo anno di specialità e proseguita durante questi ultimi 3 anni. Inizialmente la biologia molecolare e l'istologia non hanno dato risultati confortanti, ciò ci ha spinto a cercare collaborazioni ed analisi diverse e solo in questi ultimi 2, anni lo sviluppo delle collaborazioni che han reso possibile l'analisi immunoistochimica, l'immunofluorescenza e la risonanza magnetica hanno permesso di ottenere buoni risultati. L'analisi dei campioni si è sempre svolta con molte difficoltà e spesso con lunghi tempi di attesa, per questo dopo un protocollo sperimentale veniva spesso iniziato un nuovo protocollo sperimentale, questo ha comportato di occuparsi nello stesso periodo di 2 o 3 progetti diversi sempre accomunati dall'induzione di un arresto cardiaco e dalla riperfusione tramite il nostro modello di CPB. Proprio per questi aspetti comuni tra i vari progetti e per la contemporaneità dello sviluppo dei diversi protocolli ho deciso di riportare nella tesi di dottorato tutto quanto era stato fatto, limitandomi però agli aspetti neuroprotettivi e tralasciando i risultati ottenuti tramite analisi dell'emodinamica e del tessuto miocardico.

Lo sviluppo dei 3 modelli sperimentali descritti all'interno della tesi permette la riproduzione di diversi scenari clinici di interesse cardiocirurgico, anestesilogico e rianimatorio e del campo della medicina d'urgenza. Con il passare del tempo e degli esperimenti (circa 200 esperimenti andati a buon fine) le tecniche chirurgiche necessarie sono state affinate riportando una sempre migliore riproducibilità e standardizzazione dei diversi modelli.

A conclusione della tesi possiamo dire che i risultati più significativi sono stati ottenuti col trattamento ipotermico e col trattamento con NO, che il modello con perfusione cerebrale selettiva sembra essere un buon modello di partenza per studi in questo campo e che l'ipotermia farmacologica con WIN55-212 non è inferiore all'ipotermia topica moderata. I risultati più ambigui invece derivano dagli studi in cui è stato analizzato ALM che ha dato risultati in alcuni aspetti positivi e in alcuni altri negativi.

Le implicazioni cliniche derivanti dagli esperimenti effettuati potrebbero essere rilevanti in particolare per il trattamento con iNO dopo arresto cardiaco e trattamento con ECLS. Sempre

più frequentemente infatti i pazienti con arresto cardiaco testimoniato e refrattario vengono trattati con ECMO-VA e in più del 30% dei casi riportano danni neurologici gravi. L'utilizzo dell'ossido nitrico potrebbe ridurre il danno neurologico, ridurre edema cerebrale e migliorare di un certo grado le condizioni cliniche del paziente. Tuttavia, il danno da ischemia e riperfusione cerebrale dovuto all'arresto cardiaco risulta solo in parte trattabile e apre altre problematiche di tipo anche etico: la riduzione del danno cerebrale potrebbe infatti evitare la morte cerebrale, riducendo edema ed infiammazione, ma potrebbe determinare un aumento degli stati vegetativi, di stati di coma irreversibile e di danno neurologico severo e quindi mettendo in questione l'utilità e la necessità di alcuni specifici trattamenti atti a salvare i tessuti e gli organi più che il paziente come persona. Per questi motivi la ricerca nel campo della neuroprotezione deve proseguire approfondendo la funzione e l'efficacia di NO e di altre molecole, non prescindendo però anche da studi di fisiologia funzionale e comportamentale e non basandosi solo sui risultati dell'istologia o dei marker di infiammazione studiati in questa tesi. I risultati riportati e la scelta dei marker di infiammazione analizzati sono stati spesso dovuti ad obblighi logistici e a causa della nostra conoscenza limitata in questo campo sul tipo di analisi necessarie e sempre più sofisticate richieste dalla comunità scientifica. Col passare degli anni grazie alla conoscenza di collaboratori validi è stato possibile affinare anche le tecniche di analisi ma c'è ancora molto spazio per migliorare.

Sono convinto che la possibilità di sfruttare questi modelli sperimentali, ora facilmente riproducibili e a basso costo porterà ad una migliore conoscenza in questo campo e allo sviluppo di numerosi altri protocolli sperimentali ed ad ulteriori collaborazioni con miglioramento delle analisi e del potere statistico dei risultati ottenuti.

Se in futuro avrò la possibilità di proseguire con la ricerca in questo campo continuerò ad indagare gli effetti a livello cardiaco e cerebrale di NO che rappresenta l'ultimo protocollo effettuato in ordine cronologico e le cui analisi sono ancora in corso ma che ha dato fino ad ora i risultati più promettenti. Probabilmente iNO attraverso l'ossigenatore dell'ECMO sarà presto utilizzato anche in ospedale dato che è già presente come farmaco e che i ricercatori di Melbourne stanno già utilizzando nei bambini sottoposti ad interventi cardiocirurgici. Da scoprire potrebbe essere anche l'effetto del NO-donor S-NO-HSA (albumina sierica umana nitrosilata) che in passato abbiamo impiegato in modelli di ischemia e riperfusione miocardica ma non abbiamo mai indagato i suoi effetti nell'ischemia e riperfusione cerebrale.

10. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Braunwald E, Mann LD, Zipes PD, Libby P, Bonow R. Malattie del cuore di Braunwald, Trattato di medicina cardiovascolare, cap 41, pp 893-894.
- ² Mangiacapra F, De Bruyne B, Wijns W, and Bartunek J. (2011). Optimizing revascularization strategies in coronary artery disease for optimal benefit to patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011; 90:630-633.
- ³ ECC Committee, Subcommittees and Task Forces of the American Heart Association: 2005 AHA Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2005;112 (Suppl):IV1.
- ⁴ Goldman S, Zadina K, Moritz T et al. Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:2149-2156.
- ⁵ Negovsky VA. The second step in resuscitation - the treatment of the "post-resuscitation disease". *Resuscitation.* 1972;1:1-7.
- ⁶ Negovsky VA, Gurvitch AM. Post-resuscitation disease - a new nosological entity. Its reality and significance. *Resuscitation.* 1995;30:23-7.
- ⁷ Michenfelder JD, Theye RA. Cerebral protection by thiopental during hypoxia. *Anesthesiology.* 1973;39(5) 510-517.
- ⁸ Robbins SL, Cotran RS: Le basi patologiche delle malattie 7th edizione. Kumar V, Abbas AK, Fausto N eds Elsevier Inc, 2005, pp 14-26.
- ⁹ Baena RC, Busto R, Dietrich WD, et al. Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia. *Neurology* 1997;48:768-773.
- ¹⁰ Wong KC. Physiology and pharmacology of hypothermia. *West J Med.* 1983 Feb;138(2):227-32.
- ¹¹ Smith LW, Fay T: Observations on human beings with cancer maintained at reduced temperature of 75-90 Fahrenheit. *Am J Clin Pathol.* 1940;10:1-11.
- ¹² Talbott JH. Physiologic and therapeutic effects of hypothermia. *N Engl J Med.* 1941;224:281-288.
- ¹³ Botterell EH, Loughheed WM, Morley TP, Vandewater SL. Hypothermia in the surgical treatment of ruptured intracranial aneurysms. *J Neurosurg.* 1958;15:4-18.
- ¹⁴ Rosomoff HL. Protective effects of hypothermia against pathologic processes of the nervous system. *Ann NY Acad Sci.* 1959;80:475-486.
- ¹⁵ Bigelow WG, Callaghan JC, Hopps JA. General hypothermia for experimental intracardiac surgery. *Ann Surg.* 1950;132:531-537.

-
- ¹⁶ Benson DW, Williams GR Jr, Spencer FC, Yates AJ. The use of hypothermia after cardiac arrest. *Anesth Analg*. 1959 Nov Dec;38:423-8.
- ¹⁷ Williams GR Jr, Spencer FC. The clinical use of hypothermia following cardiac arrest. *Annals of Surgery*. 1958 Sep;148(3):462-468.
- ¹⁸ Chopp M, Knight R, Tidwell CD, et al. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral recirculation in the cat: a comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989;9:141-8.
- ¹⁹ Busto R, Globus MYT, Dietrich WD, et al. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke*. 1989;20:904-10.
- ²⁰ The Hypothermia After Cardiac Arrest study group: Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2002;346:549–556.
- ²¹ Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*. 2002;346:557-63.
- ²² Bernard SA, Jones BM, Horne MK. Clinical trial of induced hypothermia in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Ann Emerg Med*. 1997 Aug;30(2):146-53.
- ²³ Nolan JP, Morley MD, Vanden Hoek TL, et al. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. An advisory statement by the advanced life support task force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Resuscitation*. 2003;57:231.
- ²⁴ Nolan JP, Deakin CD, et al. European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation* 2005 Dec; 67 Suppl 1:S39-86.
- ²⁵ Deakin CD, Nolan JP, Soar J, et al. European Resuscitation Council Guidelines ^[1]_[SEP] for Resuscitation 2010 Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2010;81:1305-52.
- ²⁶ Silvast T, Tiainen M, Poutiainen E, Roine RO. Therapeutic hypothermia after prolonged cardiac arrest due to non- coronary causes. *Resuscitation*. 2003;57:109-12.
- ²⁷ Guyton AC , Hall JE. *Fisiologia medica* 11th edizione. Elsevier Inc, 2006;889-900.
- ²⁸ Michenfelder JD, Theye RA. Hypothermia: effect on canine brain and whole-body metabolism. *Anesthesiology*. 1968;29(6):1107-1111.
- ²⁹ McCullough JN, Zhang N, Reich DL, et al. Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans. *Ann Thorac Surg*. 1999;67:1895-9; discussion 919-21.
- ³⁰ Robert M. Friedlander, M.D. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *N Engl J Med*. 2003;348:1365-75.
- ³¹ Xu L, Yenari MA, Steinberg GK, et al: Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:21-28.

-
- ³² Ning XH, Chen SH, Xu CS, et al: Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J Appl Physiol*. 2002;92:2200-2207.
- ³³ Siesjo BK, Bengtsson F, Grampp W, et al: Calcium, excitotoxins, and neuronal death in brain. *Ann NY Acad Sci*. 1989;568:234-251.
- ³⁴ Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, et al: Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: Influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma*. 2004;21:1706-1711.
- ³⁵ Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H, et al: Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Crit Care Med*. 2002;30:1499-1502.
- ³⁶ Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, et al. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma*. 1999;16:225-232.
- ³⁷ Globus MY-T, Busto R, Lin B, et al: Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: Effects of intransischemic brain temperature modulation. *J Neurochem*. 1995;65:1250-1256.
- ³⁸ Globus MY-T, Alonso O, Dietrich WD, et al: Glutamate release and free radical production following brain injury: Effects of post-traumatic hypothermia. *J Neurochem*. 1995;65:1704-1711.
- ³⁹ Fischer S, Clauss M, Wiesnet M, et al. Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. *Am J Physiol*. 1999;276:C812-C820.
- ⁴⁰ Huang ZG, Xue D, Preston E, et al: Biphasic opening of the blood– brain barrier following transient focal ischemia: Effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci*. 1999;26: 298-304.
- ⁴¹ Chi OZ, Liu X, Weiss HR. Effects of mild hypothermia on blood– brain barrier disruption during isoflurane or pentobarbital anesthesia. *Anesthesiology*. 2001;95: 933-938.
- ⁴² Fischer S, Renz D, Wiesnet M, et al: Hypothermia abolishes hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;74:135-144.
- ⁴³ Schwab S, Spranger M, Aschhoff A, et al. Brain temperature monitoring and modulation in patients with severe MCA infarction. *Neurology*. 1997;48:762-767.
- ⁴⁴ Schwarz S, Hafner K, Aschoff A, et al: Incidence and prognostic significance of fever following intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2000;54:354-361.
- ⁴⁵ Lanier WL. Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1995;7:216-221.
- ⁴⁶ Bottiger BW, Motsch J, Bohrer H, et al: Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 1995;92:2572-2578.

-
- ⁴⁷ Fischer M, Bottiger BW, Popov-Cenic S, et al. Thrombolysis using plasminogen activator and heparin reduces cerebral no-reflow after resuscitation from cardiac arrest: An experimental study in the cat. *Intensive Care Med.* 1996;22:1214-1223.
- ⁴⁸ Watts DD, Trask A, Soeken K, et al. Hypothermic coagulopathy in trauma: Effect of varying levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity. *J Trauma.* 1998;44:846-854.
- ⁴⁹ Jordan KG. Nonconvulsive status epilepticus in acute brain injury. *J Clin Neurophysiol* 1999; 16:332-340.
- ⁵⁰ Krumholz A. Epidemiology and evidence for morbidity of nonconvulsive status epi- lepticus. *J Clin Neurophysiol* 1999;16:314-322.
- ⁵¹ Corry JJ, Dhar R, Murphy T, et al. Hypothermia for refractory status epilepticus. *Neurocrit Care* 2008;9:189-197.
- ⁵² Tortorici MA, Kochanek PM, Poloyac SM. Effects of hypothermia on drug disposition, metabolism, and response: A focus of hypothermia-mediated alterations on the cytochrome P450 enzyme system (review). *Crit Care Med.* 2007;35:2196-2204.
- ⁵³ Van den Bergh WM, Algra A, van Kooten F, et al. Magnesium sulfate in aneurysmal sub- arachnoid hemorrhage: A randomized controlled trial. *Stroke.* 2005;36:1011-1015.
- ⁵⁴ Polderman KH, Zanten ARH van, Girbes ARJ. The importance of magnesium in critically ill patients: A role in mitigating neurological injury and in the prevention of vasospasms. *Intensive Care Med.* 2003;29:1202-1203.
- ⁵⁵ Capes SE, Hunt D, Malmberg K, et al. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in non-diabetic and diabetic patients: A systematic overview. *Stroke.* 2001;32: 2426-2432.
- ⁵⁶ Michelson AD, MacGregor H, Barnard MR, et al. Hypothermia-induced reversible platelet dysfunction. *Thromb Haemost.* 1994;71:633-640.
- ⁵⁷ Reed RL, Bracey AW, Hudson JD, et al. Hypothermia and blood coagulation: dissociation between enzyme activity and clotting factor levels. *Circ Shock.* 1990;32:141-152.
- ⁵⁸ Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet.* 2008;371:1955-1969.
- ⁵⁹ Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R, et al: Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. *N Engl J Med.* 1996;334:1209-1215.
- ⁶⁰ Polderman KH. Application of therapeutic hypothermia in the intensive care unit. Opportunities and pitfalls of a promising treatment modality, Part 2. Practical aspects and side effects. *Intensive Care Med.* 2004;30:757-769.

-
- ⁶¹ Alzaga AG, Cerdan M, Varon J. Therapeutic hypothermia. *Resuscitation*. 2006;70(3):369-380.
- ⁶² Mayer SA, Kowalski RG, Presciutti M, et al. Clinical trial of a novel surface cooling system for fever control in neurocritical care patients. *Crit Care Med*. 2004;32:2508-15.
- ⁶³ Bernard S, Buist M, Monteiro O, Smith K. Induced hypothermia using large volume, ice-cold intravenous fluid in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest: a preliminary report. *Resuscitation*. 2003;56:9-13.
- ⁶⁴ Kliegel A, Janata A, Wandaller C, et al. Cold infusions alone are effective for induction of therapeutic hypothermia but do not keep patients cool after cardiac arrest. *Resuscitation*. 2007 Apr; 73(1):46-53.
- ⁶⁵ Kuboyama K, Safar P, Radovsky A, et al. Delay in cooling negates the beneficial effect of mild hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study. *Resuscitation*. 2003;57:231-235.
- ⁶⁶ Hickey RW, Ferimer H, Alexander HL, et al. Delayed, spontaneous hypothermia reduces neuronal damage after asphyxial cardiac arrest in rats. *Crit Care Med*. 2000;28:3511-6.
- ⁶⁷ Lawrence EJ, Dentcheva E, Curtis KM, et al. Neuroprotection with delayed initiation of prolonged hypothermia after in vitro transient global brain ischemia. *Resuscitation*. 2005;64:383-388.
- ⁶⁸ Nolan JP, Hazinski MF, Steen PA, Becker LB. Controversial topics from the 2005 International Consensus Conference on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations. *Resuscitation*. 2005;67:175-179.
- ⁶⁹ Kees H, Polderman. Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med*. 2004;30:556-575.
- ⁷⁰ Dobson GP. Organ arrest, protection and preservation: natural hibernation to cardiac surgery. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 139. 2004;469-485.
- ⁷¹ Schultz JEJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by δ but not κ or μ opioid receptors. *Circulation*. 1998;97:1282-1289.
- ⁷² Lv MR, Li B, Wang MG, et al. Activation of the PI3K-Akt pathway promotes neuroprotection of the δ -opioid receptor agonist against cerebral ischemia-reperfusion injury in rat models. *Biomed Pharmacother*. 2017 Sep;93:230-237.
- ⁷³ Zhu M, Liu M, Guo QL, et al. Prolonged DADLE exposure epigenetically promotes Bcl-2 expression and elicits neuroprotection in primary rat cortical neurons via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2018 Oct;39(10):1582-1589.
- ⁷⁴ Moghal ETB, Venkatesh K, Sen D. The delta opioid peptide D-Alanine 2, Leucine 5 Enkephaline (DADLE)-induces neuroprotection through cross-talk between the UPR and pro-survival MAPK-

NGF-Bcl2 signaling pathways via modulation of several micro-RNAs in SH-SY5Y cells subjected to ER stress. *Cell Biol Int*. 2018 May;42(5):543-569.

⁷⁵ Fu D, Liu H, Li S, et al. Antioxidative and Antiapoptotic Effects of Delta-Opioid Peptide [D-Ala², D-Leu⁵] Enkephalin on Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits. *Front Neurosci*. 2017 Oct 31;11:603.

⁷⁶ Ovadia H, Wohlman A, Mechoulam R, Weidenfeld J. Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat. Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. *Neuropharmacology*. 1995;34:175-180.

⁷⁷ Fox A, Kesingland A, Gentry C, et al. The role of central and peripheral cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*. 2001;92:91-100.

⁷⁸ Compton DR, Gold LH, Ward SJ, et al. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263:1118-1126.

⁷⁹ Jansen EM, Haycock DA, Ward SJ, Seybold VS. Distribution of cannabinoid receptors in rat brain determined with aminoalkylindoles. *Brain Res*. 1992;575:93-102.

⁸⁰ Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, et al. SR141617A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*. 1994;350:240-244.

⁸¹ Compton DR, Aceto M, Lowe J, Martin BR. In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetra- hydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;277:586-594.

⁸² Rawls SM, Cabassa J, Geller EB, Adler MW. CB1 receptors in the preoptic anterior hypothalamus regulate WIN 55212-2 [(4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1ij]quinolin-6-one)-induced hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jun; 301(3):963-968.

⁸³ Lewis FJ, Taufic M. Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery*. 1953;33(1):52-59.

⁸⁴ Borst HG, Schaudig A, Rudolph W. Arterovenous fistula of the aortic arch: repair during deep hypothermia and circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1964;48:443-447.

⁸⁵ Lillehei CW, Todd DB Jr, Levy MJ, Ellis RJ. Partial cardiopulmonary bypass, hypothermia, and total circulatory arrest. A lifesaving technique for ruptured mycotic aortic aneurysms, ruptured left ventricle, and other complicated cardiac pathology. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;58(4):530-544.

⁸⁶ Griepp RB, Stinson EB, Hollingsworth JF, Buehler D. Prosthetic replacement of the aortic arch. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1975;70:1051-1063.

-
- ⁸⁷ Ergin MA, O'Connor J, Guinto R, Griepp RB. Experience with profound hypothermia and circulatory arrest in the treatment of aneurysms of the aortic arch. Aortic arch replacement for acute arch dissections. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;84:649-655.
- ⁸⁸ Strauch JT, Spielvogel D, Lauten A, et al. Axillary artery cannulation: routine use in ascending aorta and aortic arch replacement. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(1):103-108.
- ⁸⁹ Gega A, Rizzo JA, Johnson MH, et al. Straight deep hypothermic arrest: experience in 394 patients supports its effectiveness as a sole means of brain preservation. *Ann Thorac Surg.* 2007;84(3):759-766.
- ⁹⁰ Griepp RB, Di Luozzo G. Hypothermia for aortic surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145:S56-58.
- ⁹¹ Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, et al. Deep hypothermia with circulatory arrest. Determinants of stroke and early mortality in 656 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106(1):19-28.
- ⁹² Ergin MA, Griepp EB, Lansman SL, et al. Hypothermic circulatory arrest and other methods of cerebral protection during operations on the thoracic aorta. *J Card Surg.* 1994;9(5):525-537.
- ⁹³ Ergin MA, Uysal S, Reich DL, et al. Temporary neurological dysfunction after deep hypothermic circulatory arrest: a clinical marker of long-term functional deficit. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:1887-1890.
- ⁹⁴ Asou T, Kado H, Imoto Y, et al. Selective cerebral perfusion technique during aortic arch repair in neonates. *Ann Thorac Surg.* 1996;61(5):1546-1548.
- ⁹⁵ Cook RC, Gao M, Macnab AJ, et al. Aortic arch reconstruction: safety of moderate hypothermia and antegrade cerebral perfusion during systemic circulatory arrest. *J Card Surg.* 2006;21(2):158-164.
- ⁹⁶ Sanioglu S, Sokullu O, Arslan IY, et al. Comparison of unilateral antegrade cerebral perfusion at 16 degrees C and 22 degrees C systemic temperature. *Heart Surg Forum.* 2009;12(2):E65-69.
- ⁹⁷ Dumfarth J, Ziganshin BA, Tranquilli M, Elefteriades JA. Cerebral Protection in Aortic Arch Surgery. Hypothermia Alone Suffices. *Tex Heart Inst J.* 2013;40(5):564-565.
- ⁹⁸ Bachet J. What is the best method for brain protection in surgery of the aortic arch? Selective antegrade cerebral perfusion. *Cardiol Clin.* 2010;28:389-401.
- ⁹⁹ DeBaakey M, Crawford ES, Cooley DA, Morris GC. Successful resection of fusiform aneurysm of aortic arch with replacement by homograft. *Surg Gynecol Obstet.* 1957;105(6):657-664.
- ¹⁰⁰ Bachet J, Guilmet D, Goudot B, et al. Antegrade cerebral perfusion with cold blood: a 13-year experience. *Ann Thorac Surg.* 1999;67(6):1874-1878.
- ¹⁰¹ Kazui T, Washiyama N, Muhammad BA, et al. Improved results of atherosclerotic arch aneurysm operations with a refined technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:491-499.

-
- ¹⁰² Di Eusanio M, Schepens MA, Morshuis WJ, et al. Brain protection using antegrade selective cerebral perfusion: a multicenter study. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(4):1181-1188.
- ¹⁰³ Panos A, Murith N, Bednarkiewicz M, Khatchatourov G. Axillary cerebral perfusion for arch surgery in acute type A dissection under moderate hypothermia. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;29:1036-9.
- ¹⁰⁴ Sabik JF, Lytle BW, McCarthy PM, Cosgrove DM. Axillary artery: an alternative site of arterial cannulation for patients with extensive aortic and peripheral vascular disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109(5):885-890.
- ¹⁰⁵ Moizumi Y, Motoyoshi N, Sakuma K, Yoshida S. Axillary artery cannulation improves operative results for acute type a aortic dissection. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(1):77-83.
- ¹⁰⁶ Svensson LG, Blackstone EH, Rajeswaran J, et al. Does the arterial cannulation site for circulatory arrest influence stroke risk? *Ann Thorac Surg.* 2004;78:1274-1284.
- ¹⁰⁷ Stavros N, Siminelakis S, Baikoussis N, et al. Axillary artery cannulation for cardiopulmonary bypass during surgery on the ascending aorta and arch. *J Card Surg.* 2009;24(3):301-304.
- ¹⁰⁸ Wong DR, Coselli JS, Palmero L, et al. Axillary artery cannulation in surgery for acute or subacute ascending aortic dissections. *Ann Thorac Surg.* 2010;90(3):731-737.
- ¹⁰⁹ Kazui T, Inoue N, Yamada O, Komatsu S. Selective cerebral perfusion during operation for aneurysms of the aortic arch: A reassessment. *Ann Thorac Surg.* 1992;53:109-114.
- ¹¹⁰ Kazui T, Inoue N, Yamada O, Komatsu S. Total arch replacement using aortic arch branched grafts with the aid of antegrade selective cerebral perfusion. *Ann Thorac Surg.* 2000;70:3-8.
- ¹¹¹ Di Eusanio M, Wesselink RMJ, Morshuis WJ, et al. Deep hypothermic circulatory arrest and antegrade selective cerebral perfusion during ascending aorta-hemiarch replacement: a retrospective comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125:849-854.
- ¹¹² Matalanis G, Hata M, Buxton BF. A retrospective comparative study of deep hypothermic circulatory arrest, retrograde, and antegrade cerebral perfusion in aortic arch surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;9:174-179.
- ¹¹³ Coselli JS, LeMaire SA. Experience with retrograde cerebral perfusion during proximal aortic surgery in 290 patients. *J Cardiac Surg.* 1997;12:322-325.
- ¹¹⁴ Ye J, Yang L, Del Bigio MR, et al. Retrograde cerebral perfusion provides limited distribution of blood to the brain: A study in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;114:660-665.
- ¹¹⁵ Westaby S, Katsumata T, Vaccari G. Arch and descending aortic aneurysms: Influence of perfusion technique on neurological outcome. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1000;15:180-185.
- ¹¹⁶ Strauch JT, Spielvogel D, Lauten A, et al. Technical advances in total aortic arch replacement. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:581-589.

-
- ¹¹⁷ Spielvogel D, Halstead JC, Meier M, et al. Aortic arch replacement using a trifurcated graft: Simple, versatile, and safe. *Ann Thorac Surg.* 2005;80:90-95.
- ¹¹⁸ Halkos ME, Kerendi F, Myung R, et al. Selective antegrade cerebral perfusion via right axillary artery cannulation reduces morbidity and mortality after proximal aortic surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(5):1081-1089.
- ¹¹⁹ Leshnower BG, Myung RJ, Kilgo PD, et al. Moderate hypothermia and unilateral selective antegrade cerebral perfusion: a contemporary cerebral protection strategy for aortic arch surgery. *Ann Thorac Surg.* 2010;90(2):547-554.
- ¹²⁰ Zierer A, El-Sayed Ahmad A, Papadopoulos N, et al. Selective antegrade cerebral perfusion and mild (28C-30 C) systemic hypothermic circulatory arrest for aortic arch replacement: Results from 1002 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;144(5):1042-1049.
- ¹²¹ Mault JR, Ohtake S, Klingensmith ME, et al. Cerebral metabolism and circulatory arrest: Effects of duration and strategies for protection. *Ann Thorac Surg.* 1993;55:57-63.
- ¹²² Midulla PS, Gandsas A, Sadeghi AM, et al. Comparison of retrograde cerebral perfusion to antegrade cerebral perfusion and hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model. *J Cardiovasc Surg.* 1994;9:560-574.
- ¹²³ Stecker MM, Cheung AT, Pochettino A, et al. Deep hypothermic circulatory arrest: I. Effects of cooling on electroencephalogram and evoked potentials. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:14-21.
- ¹²⁴ Lemole GM, Strong MD, Spagna PM, Karmilowicz NP. Improved results for dissecting aneurysms. Intraluminal sutureless prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;83(2):249-255.
- ¹²⁵ Ueda Y, Miki S, Kusuhara K, et al. Surgical treatment of aneurysm or dissection involving the ascending aorta and aortic arch, utilizing circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion. *J Cardiovasc Surg.* 1990;31(5):553-558.
- ¹²⁶ Ueda Y, Miki S, Kusuhara K, et al. Deep hypothermic systemic circulatory arrest and continuous retrograde cerebral perfusion for surgery of aortic arch aneurysm. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1992;6:36-41.
- ¹²⁷ Usui A, Hotta T, Hirouraa M, et al. Retrograde cerebral perfusion through a superior vena caval cannula protects the brain. *Ann Thorac Surg.* 1992;53:47-53.
- ¹²⁸ Anttila V, Pokela M, Kiviluoma K, et al. Is maintained cranial hypothermia the only factor leading to improved outcome after retrograde cerebral perfusion? An experimental study with a chronic porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119:1021-1029.
- ¹²⁹ Apostolakis E, Akinosoglou K. The methodologies of hypothermic circulatory arrest and of antegrade and retrograde cerebral perfusion for aortic arch surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;14(3):138-148.

-
- ¹³⁰ Yerlioglu ME, Wolfe D, Mezrow CK, et al. The effect of retrograde cerebral perfusion after particulate embolization to the brain. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110:1470-1484.
- ¹³¹ Juvonen T, Zhang N, Wolfe D, et al. Retrograde cerebral perfusion enhances cerebral protection during prolonged hypothermic circulatory arrest: A study in a chronic porcine model. *Ann Thorac Surg.* 1998;66:38-50.
- ¹³² Deeb GM, Jenkins E, Bolling SF, et al. Retrograde cerebral perfusion during hypothermic circulatory arrest reduces neurologic morbidity. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109(2):259-268.
- ¹³³ Ye J, Ryner LN, Kozlowski P, et al. Retrograde cerebral perfusion results in flow distribution abnormalities and neuronal damage. A magnetic resonance imaging and histopathological study in pigs. *Circulation.* 1998(19 Suppl):II313-318.
- ¹³⁴ Khorsandi M, Dougherty S, Young N, et al. Extracorporeal life support for refractory cardiac arrest from accidental hypothermia: a 10-year experience in Edinburgh. *The Journal of Emergency Medicine.* 2017;52(2):160-168.
- ¹³⁵ Peiris AN, Jaroudi S, Gavin M. Hypothermia. *JAMA.* 2018 Mar 27;319(12):1290.
- ¹³⁶ Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, et al. Harrison principles of internal medicine. The McGraw-Hill Companies, 2012. p.167-171. Vol. 1.
- ¹³⁷ Topjian AA, Berg RA, Bierens JJ, et al. Brain resuscitation in the drowning victim. *Neurocrit Care.* 2012;17(3):441-467.
- ¹³⁸ Golden F. Mechanism of body cooling in submersed victims. *Resuscitation.* 1997;35(2):107-109.
- ¹³⁹ Brugger H, Paal P, Boyd J. Prehospital resuscitation of the buried avalanche victim. *High Alti Med Biol.* 2011;12(3):199-205.
- ¹⁴⁰ Scandroglia AM, Bove T, Calabrò MG, et al. Extracorporeal membrane oxygenation to resuscitate a 14-year-old boy after 43min drowning. *Med Intensiva.* 2018 Nov;42(8):509-510
- ¹⁴¹ Forti A, Brugnaro P, Rauch S et al. Hypothermic Cardiac Arrest With Full Neurologic Recovery After Approximately Nine Hours of Cardiopulmonary Resuscitation: Management and Possible Complications. *Ann Emerg Med.* 2019 Jan;73(1):52-57.
- ¹⁴² Brown DJA. Hypothermia. Tintinalli JE. Emergency Medicine. New York: McGraw-Hill, 2015: 1357-1365.
- ¹⁴³ Paal P, Gordon L, Strapazzon G, et al. Accidental hypothermia - an update. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine.* Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2016;24:111.
- ¹⁴⁴ Parnia S, Nasir A, Shah C, et al. A feasibility study evaluating the role of cerebral oxymetry in predicting return of spontaneous circulation in cardiac arrest. *Resuscitation.* 2012;83(8):982-985.

-
- ¹⁴⁵ Kaji AH, Hanif AM, Bosson N, et al. Predictors of neurologic outcome in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest using classification and regression tree analysis. *Am J Cardiol.* 2014;114(7):1024-1028.
- ¹⁴⁶ Truhlar A, Deakin CD, Soar J, et al. Europeans Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 4. Cardiac arrest in special circumstances. *Resuscitation.* 2015;95:148-201.
- ¹⁴⁷ Vanden Hoek TL, Morrison LJ, Shuster M, et al. Part 12: cardiac arrest in special situations: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2010;122(18 Suppl 3):S829-61.
- ¹⁴⁸ Dunne B, Christou E, Duff O, Merry C. Extracorporeal-Assisted Rewarming in the Management of Accidental Deep Hypothermic Cardiac Arrest: A Systematic Review of the Literature. *Heart Lung Circ.* 2014;23(11):1029-1035.
- ¹⁴⁹ Ruttman E, Weissenbacher A, Ulmer H, et al. Prolonged extracorporeal membrane oxygenation-assisted support provides improved survival in hypothermic patients with cardiocirculatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134(3):594-600.
- ¹⁵⁰ Debaty G, Maignan M, Perrin B, et al. Deep hypothermic cardiac arrest treated by extracorporeal life support in a porcine model: does the rewarming method matter? *Acad Emerg Med.* 2016 Jun;23(6):665-73.
- ¹⁵¹ Schubert T, Vetter H, Owen P, et al. Adenosine versus potassium cardioplegia: effects on cardiac arrest and post ischemic recovery in the isolated rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989Dec;98(6):1057-65.
- ¹⁵² Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929 Nov 25;68(3):213-37.
- ¹⁵³ Honey RM, Ritchie WT, Thomson WAR. The action of adenosine upon the human heart. *An International Journal of Medicine.* 1930;23(92):485-489.
- ¹⁵⁴ E Somló. Adenosine triphosphate in paroxysmal tachycardia. *The Lancet.* 1955;265(6874):P1125.
- ¹⁵⁵ Andrew C Newby. Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends in Biochemical Sciences.* 1984;9(2):42-44.
- ¹⁵⁶ Sheth S, Brito R, Mukherjee D, et al. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation *Int J Mol Sci.* 2014 Jan 28;15(2):2024-52.
- ¹⁵⁷ Daval JL, Nicolas F. Opposite effects of cyclohexyladenosine and theophylline on hypoxic damage in cultured neurons. *Neurosci Lett.* 1994 Jul 4;175(1-2):114-116.
- ¹⁵⁸ Sutherland GR, Peeling J, Lesiuk HJ, et al. The effects of caffeine on ischemic neuronal injury as determined by magnetic resonance imaging and histopathology. *Neuroscience.* 1991;42(1):171-182.

-
- ¹⁵⁹ Jones PA, Smith RA, Stone TW. Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A2A receptor agonists and antagonists. *Neuroscience*. 1998 Jul;85(1):229-237.
- ¹⁶⁰ Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, et al. A2A Adenosine Receptor Deficiency Attenuates Brain Injury Induced by Transient Focal Ischemia in Mice. *J Neurosci*. 1999 Nov 1;19(21):9192-9200.
- ¹⁶¹ Sebastião AM, Ribeiro JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Sep;21(9):341-346
- ¹⁶² Sinkiewicz W, Marzec A, Hoffman A, et al. Therapeutic effectiveness of lidocaine in patients with ventricular arrhythmias estimated relative to measurements of drug concentration in serum. *Kardiol Pol*. 1989;32(7-9):366-371.
- ¹⁶³ Wyman MG, Wyman RM, Cannom DS, Criley JM. Prevention of primary ventricular fibrillation in acute myocardial infarction with prophylactic lidocaine. *Am J Cardiol*. 2004 Sep 1;94(5):545-551.
- ¹⁶⁴ Yadav AV, Zipes DP. Prophylactic Lidocaine in Acute Myocardial Infarction: Resurface or Reburial? *Am J Cardiol*. 2004 Sep 1;94(5):606-608.
- ¹⁶⁵ Imaizumi U, Furuya M, Itakura S, et al. Effects of Lidocaine on Ischemia/Reperfusion Injury in In vivo Rabbit Hearts. *J Anesth Clin Res*. 2012;3:261.
- ¹⁶⁶ Kaczmarek DJ1, Herzog C, Larmann J, et al. Lidocaine Protects from Myocardial Damage due to Ischemia and Reperfusion in Mice by its antiapoptotic effects. *Anesthesiology*. 2009 May;110(5):1041-9.
- ¹⁶⁷ Lei B, Popp S, Capuano-Waters C, et al. Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*. 2004;125(3):691-701.
- ¹⁶⁸ Shokunbi MT, Gelb AW, Wu XM, Miller DJ. Continuous lidocaine infusion and focal feline cerebral ischemia. *Stroke*. 1990 Jan;21(1):107-111.
- ¹⁶⁹ Mitchell SJ, Merry AF, Frampton C, et al. Cerebral protection by lidocaine during cardiac operations: a follow-up study. *Ann Thorac Surg*. 2009 Mar;87(3):820-825.
- ¹⁷⁰ Mathew JP, Mackensen GB, Phillips-Bute B, et al. Neurologic Outcome Research Group (NORG) of the Duke Heart Center. Randomized, Double-Blinded, Placebo Controlled Study of Neuroprotection With Lidocaine in Cardiac Surgery. *Stroke*. 2009 Mar;40(3):880-887.
- ¹⁷¹ Fukuda S, Warner DS. Cerebral protection. *Br J Anaesth*. 2007 Jul;99(1):10-17.
- ¹⁷² Werdehausen R, Braun S, Essmann F, et al. Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology*. 2007 Jul;107(1):136-143.
- ¹⁷³ Friederich P, Schmitz TP. Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *Eur J Anaesthesiol*. 2002 Aug;19(8):564-570.

-
- ¹⁷⁴ Johnson ME, Uhl CB, Spittler KH, et al. Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. *Anesthesiology*. 2004;101(5):1184-1194.
- ¹⁷⁵ Ueshima K. Magnesium and ischemic heart disease: a review of epidemiological, experimental, and clinical evidences. *Magnes Res*. 2005 Dec;18(4):275-284.
- ¹⁷⁶ Shakerinia T, Ali IM, Sullivan JA. Magnesium in cardioplegia: is it necessary? *Can J Surg*. 1996 Oct;39(5):397-400.
- ¹⁷⁷ American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice; Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No. 455: Magnesium sulfate before anticipated preterm birth for neuroprotection. *Obstet Gynecol*. 2010 Mar;115(3):669-71.
- ¹⁷⁸ Bhudia SK, Cosgrove DM, Naugle RI et al. Magnesium as a neuroprotectant in cardiac surgery: a randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Apr;131(4):853-861.
- ¹⁷⁹ Longstreth WT, Fahrenbruch CE, Olsufka M, et al. Randomized clinical trial of magnesium, diazepam, or both after out-of-hospital cardiac arrest. *Neurology*. 2002 Aug 27;59(4):506-514.
- ¹⁸⁰ Chan MT, Boet R, Ng SC, et al. Magnesium sulfate for brain protection during temporary cerebral artery occlusion. *Acta Neurochir Suppl*. 2005;95:107-111.
- ¹⁸¹ Muir KW. New experimental and clinical data on the efficacy of pharmacological magnesium infusions in cerebral infarcts. *Magnes Res*. 1998 Mar;11(1):43-56.
- ¹⁸² Dobson GP, Jones MW. Adenosine and lidocaine: a new concept in nondepolarizing surgical myocardial arrest, protection, and preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Mar;127(3):794-805.
- ¹⁸³ Onorati F, Santini F, Dandale R, et al. "Polarizing" microplegia improves cardiac cycle efficiency after CABG for unstable angina. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 10;167(6):2739-2746.
- ¹⁸⁴ Dobson GP, Faggian G, Onorati F, Vinten-Johansen J. Hyperkalemic cardioplegia for adult and pediatric surgery: end of an era? *Front Physiol*. 2013 Aug 28;4:228.
- ¹⁸⁵ Rudd DM, Dobson GP. Eight hours of cold static storage with adenosine and lidocaine (Adenocaine) heart preservation solutions: toward therapeutic suspended animation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Dec;142(6):1552-1561.
- ¹⁸⁶ Granfeldt A, Nielsen TK, Sjølling C, et al. Adenocaine and Mg²⁺ reduce fluid requirement to maintain hypotensive resuscitation and improve cardiac and renal function in a porcine model of severe hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. 2012 Nov;40(11):3013-3025.
- ¹⁸⁷ Djabir Y, Letson HL, Dobson GP. Adenosine, lidocaine, and Mg²⁺ (ALMTM) increases survival and corrects coagulopathy after eight-minute asphyxial cardiac arrest in the rat. *Shock*. 2013 Sep;40(3):222-32.
- ¹⁸⁸ Node K, Kitakaze M. Evidence for nitric oxide production from human ischemic hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;A159.

-
- ¹⁸⁹ Shultz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a calcium independent NOS in the myocardium. *Br J Pharmacol*. 1992;105:575-580.
- ¹⁹⁰ Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH. Effects of 8-bromo-cyclic GMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:55-64.
- ¹⁹¹ Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, et al. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res*. 1997;81:372-379.
- ¹⁹² Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*. 1993 May;87(5):1468-1474.
- ¹⁹³ Quyyumi, AA, Dakak N, Andrews NP, et al. Nitric Oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1995;95:1747-1755.
- ¹⁹⁴ Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, et al. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 10;97(21):11482-11487.
- ¹⁹⁵ Tsikas D, Sandmann J, Luessen P, et al. S-Transnitrosylation of albumin in human plasma and blood in vitro and in vivo in the rat. *Biochimica et biophysica acta*. 2001 Apr 7;1546(2):422-434.
- ¹⁹⁶ Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, et al. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15;89(16):7674-7677.
- ¹⁹⁷ Liu J, Li C, Waalkes M, et al. The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* 2003;37:324-333.
- ¹⁹⁸ Fiorucci S, Antonelli E, Tocchetti P, Morelli A. Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO donor. A review of its current status. *Cardiovasc Drug Rev*. 2004;22:135-146.
- ¹⁹⁹ Hallström S, Gasser H, Neumayer C, et al. S-nitroso human serum albumin treatment reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle via nitric oxide release. *Circulation*. 2002;105:3032-3038.
- ²⁰⁰ Semsroth S, Fellner B, Trescher K, et al. S-nitroso Human Serum Albumin Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury After Cardioplegic Arrest in Isolated Rabbit Hearts. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:2226-2234.
- ²⁰¹ Dworschak M, Franz M, Hallström S, et al. S-nitroso human serum albumin improves oxygen metabolism during reperfusion after severe myocardial ischemia. *Pharmacology*. 2004 Oct;72(2):106-112.
- ²⁰² Hallström S, Franz M, Gasser H, et al. S-nitroso human serum albumin reduces ischaemia/reperfusion injury in the pig heart after unprotected warm ischaemia. *Cardiovascular research*. 2008 Feb 1;77(3):506-514.

-
- ²⁰³ Biban P. Somministrazione di Ossido Nitrico per via inalatoria nei neonati. *Minerva Anesthesiol.* 2004;70:245-50.
- ²⁰⁴ Barefield ES, Karle VA, Philips JB 3rd, Carlo WA. Inhaled nitric oxide in term infants with hypoxemic respiratory failure. *J Pediatr.* 1996;192:279-286.
- ²⁰⁵ Biban P, Pettenazzo A, Trevisanuto D, et al. Inhaled nitric oxide in newborns and children with acute hypoxemic respiratory failure. *Ped Med Chir.* 1996; 18:245-251.
- ²⁰⁶ Day RW, Lynch JM, White KS, Ward RM. Acute response to inhaled nitric oxide in newborns with respiratory failure and pulmonary hypertension. *Pediatrics.* 1996;98:698-705.
- ²⁰⁷ Kinsella JP, Neish S, Shaffer E, Abman SH. Clinical responses to prolonged treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn with low doses of inhaled nitric oxide. *J Pediatr.* 1993; 123:103-8.
- ²⁰⁸ Macrae DJ, Field D, Mercier JC, et al. Consensus conference: Inhaled nitric oxide therapy in neonates and children: reaching a European consensus. *ICM.* 2004;30:372-380.
- ²⁰⁹ Kinsella JP, Abman SH. Clinical pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn and the role of inhaled nitric oxide therapy. *J Perinatol.* 1996;16:524-527.
- ²¹⁰ Kinsella JP, Abman SH. Clinical approach to inhaled nitric oxide therapy in the newborn with hypoxemia. *J Pediatr.* 2000;136:717-726.
- ²¹¹ Roberts JD, Fineman JR, Morin FC 3rd, et al. Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. *N Engl J Med.* 1997;336:605-610.
- ²¹² The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. Inhaled nitric oxide in full term infants and nearly full term infants with hypoxic respiratory failure. *N Engl J Med.* 1997;336:597-604.
- ²¹³ Checchia PA, Bronicki RA, Muenzer JT, et al. Nitric oxide delivery during cardiopulmonary bypass reduces postoperative morbidity in children - a randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013 Sep;146(3):530-536.
- ²¹⁴ James C, Millar J, Horton S, et al. Nitric oxide administration during paediatric cardiopulmonary bypass: a randomised controlled trial. *Intensive Care Med.* 2016 Nov;42(11):1744-1752.
- ²¹⁵ Hataishi R, Rodrigues AC, Neilan TG, et al. Inhaled nitric oxide decreases infarction size and improves left ventricular function in a murine model of myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291:H379-H384.
- ²¹⁶ Liu X, Huang Y, Pokreisz P, et al. Nitric oxide inhalation improves microvascular flow and decreases infarction size after myocardial ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:808-817.

-
- ²¹⁷ Lang JD, Chumley P, Teng X, et al. Inhaled NO accelerates restoration of liver function in adults following orthotopic liver transplantation. *J Clin Invest*. 2007;117:2583-2591.
- ²¹⁸ Gianetti J, Del Sarto P, Bevilacqua S, et al. Supplemental nitric oxide and its effect on myocardial injury and function in patients undergoing cardiac surgery with extracorporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004;127:44-50.
- ²¹⁹ Kida K, Ichinose F. Preventing ischemic brain injury after sudden cardiac arrest using NO inhalation. *Crit Care*. 2014 Mar 18;18(2):212.
- ²²⁰ Godínez-Rubí M, Rojas-Mayorquín AE, Ortuño-Sahagún D. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:297357.
- ²²¹ Hill JG, Bruhn PS, Cohen SE, et al. Emergent applications of cardiopulmonary support: a multiinstitutional experience. *Ann Thorac Surg*. 1992; 54(4):699-704.
- ²²² Bartlett RH, Gazzaniga AB, Fong SW, et al. Extracorporeal membrane oxygenator support for cardiopulmonary failure. Experience in 28 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1977;73(3):375-386.
- ²²³ Pediatric Cardiac Failure, Extracorporeal Life Support Organization, Ann Arbor, MI. [cited 2017 Feb 15]. Available from www.elso.org
- ²²⁴ ELSO Adult Cardiac Failure Supplement to the ELSO Guidelines for Cardiopulmonary Extracorporeal Life Support, Extracorporeal Life Support Organization, Version 1.3, December 2013, Ann Arbor, MI, USA, www.elso.org.
- ²²⁵ Richardson AS, Schmidt M, Bailey M, et al. ECMO Cardio-Pulmonary Resuscitation (ECPR), trends in survival from an international multicentre cohort study over 12-years. *Resuscitation*. 2017 Mar;112:34-40.
- ²²⁶ Fink EL, Callaway CW, Tisherman SA, et al: Winning the cold war: Inroads into implementation of mild hypothermia after cardiac arrest in adults from the European Resuscitation Council Hypothermia After Cardiac Arrest Registry Study Group. *Crit Care Med*. 2007; 35:1199-1202.
- ²²⁷ Wolff B, Machill K, Schumacher D, et al: Early achievement of mild therapeutic hypothermia and the neurologic outcome after cardiac arrest. *Int J Cardiol* 2009;133:223-228.
- ²²⁸ Valiveti S, Hammell DC, Earles DC, Stinchcomb AL. Transdermal delivery of the synthetic cannabinoid WIN 55, 212-2: in vitro/in vivo correlation. *Pharm Res*. 2004;21:1137-1145.
- ²²⁹ Rungtatscher A, Linardi D, Giacomazzi A, et al. Cardioprotective effect of δ -opioid receptor agonist vs. mild therapeutic hypothermia in a rat model of cardiac arrest with extracorporeal life support. *Resuscitation*. 2013 Feb;84(2):244-248.

-
- ²³⁰ Letson HL, Pecheniuk NM, Mhango LP et al. Reversal of acute coagulopathy during hypotensive resuscitation using small-volume 7.5% NaCl adenocaine and Mg²⁺ in the rat model of severe hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. 2012;40(8):2417-2422.
- ²³¹ Chung HS, Park CS, Hong SH, et al. Effects of magnesium pretreatment on the levels of T helper cytokines and on the severity of reperfusion syndrome in patients undergoing living donor liver transplantation. *Magnes Res*. 2013 Apr-Jun;26(2):46-55.
- ²³² Van Der Wal S, Vaneker M, Steegers M, et al. Lidocaine increases the anti-inflammatory cytokine IL-10 following mechanical ventilation in healthy mice. *Acta Anaesthesiol Scand* 2015 Jan;59(1):47-55.
- ²³³ Németh ZH, Lutz CS, Csóka B, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol*. 2005 Dec 15; 175(12):8260-8270.
- ²³⁴ J.-T. Grasner et al. EuReCa ONE-27 Nation, ONE Europe, ONE Registry. A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation* 105 (2016) 188-195.
- ²³⁵ Gu Q, Gu H, Lu X, et al. The influence of deep hypothermic global brain ischemia on EEG in a new rat model. *J Card Surg*. 2012 Sep;27(5):612-617.
- ²³⁶ Glass PS, Bloom M, Kearse L, et al. Bispectral analysis measures sedation and memory effects of propofol, midazolam, isoflurane, and alfentanil in healthy volunteers. *Anesthesiology*. 1997 Apr;86(4):836-847.
- ²³⁷ James ML, Andersen ND, Swaminathan M, et al. Predictors of electrocerebral inactivity with deep hypothermia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Mar;147(3):1002-1007.
- ²³⁸ Linardi D, Faggian G, Rungatscher A. Temperature Management During Circulatory Arrest in Cardiac Surgery. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2016 Mar;6(1):9-16.
- ²³⁹ Martin TD, Craver JM, Gott JP. Prospective, randomized trial of retrograde warm blood cardioplegia: myocardial benefit and neurologic threat. *Ann Thorac Surg*. 1994, Vol. 57, 298-304.
- ²⁴⁰ Bar-Yosef S, Mathew JP, Newman MF, et al. Prevention of cerebral hyperthermia during cardiac surgery by limiting on-bypass rewarming in combination with post-bypass body surface warming: a feasibility study. *Anesth Analg*. 2004;99:641-646.
- ²⁴¹ Rungatscher A, Luciani GB, Linardi D, et al. Temperature Variation After Rewarming from Deep Hypothermic Circulatory Arrest Is Associated with Survival and Neurologic Outcome. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2017 Jun;7(2):101-106.
- ²⁴² Grocott HP, Mackensen GB, Grigore AM, et al. Neurologic Outcome Research Group (NORG); Cardiothoracic Anesthesiology Research Endeavors (CARE) Investigators' of the Duke Heart Center.

Postoperative hyperthermia is associated with cognitive dysfunction after coronary artery bypass graft surgery. *Stroke*. 2002 Feb;33(2):537-541.

²⁴³ Engelman RM, Pleet AB, Rousou JA. Influence of cardiopulmonary bypass perfusion temperature on neurologic and hematologic function after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*. 1999;67(6):1547-1555.

²⁴⁴ Stone JG, Young WL, Smith CR. Do standard monitoring sites reflect true brain temperature when profound hypothermia is rapidly induced and reversed? *Anesthesiology*. 1995;82(2):344-351.

²⁴⁵ Gordan ML, Kellermann K, Blobner M. Fast rewarming after deep hypothermic circulatory arrest in rats impairs histologic outcome and increases NFkB expression in the brain. *Perfusion*. 2010; 25(5):349-354.

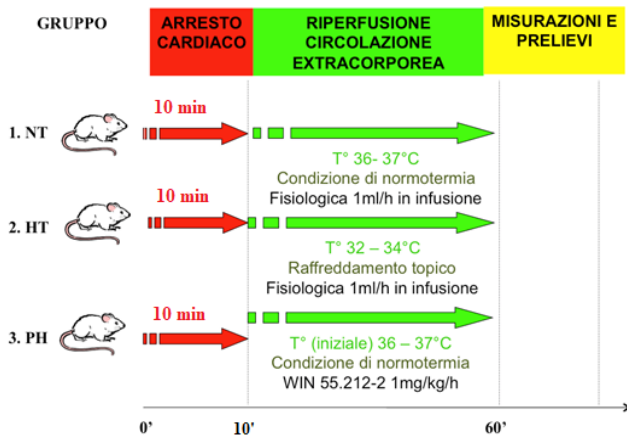
²⁴⁶ Enomoto S, Hindman BJ, Dexter F, et al. Rapid rewarming causes an increase in the cerebral metabolic rate for oxygen that is temporarily unmatched by cerebral blood flow. *Anesthesiology*. 1996; 84:1392-1400.

²⁴⁷ Berger C, Xia F, Kohrmann M, Schwab S. Hypothermia in acute stroke - Slow versus fast rewarming. An experimental study in rats. *Experimental neurology*. 2007;204:131-137.

²⁴⁸ Grigore AM, Grocott HP, Mathew JP. The rewarming rate and increased peak temperature alter neurocognitive outcome after cardiac surgery. *Anesth Analg*. 2002;94(1):4-10.

1) MODELLO DI ARRESTO CARDIACO ED ECLS

- IPOTERMIA FARMACOLOGICA

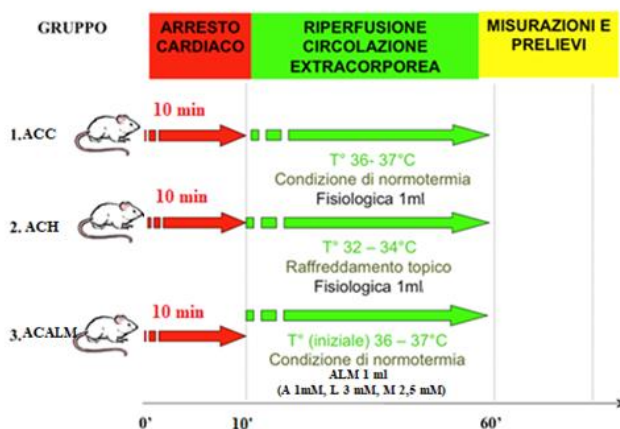


NORMOTERMIA (NT): temperatura mantenuta di 36 - 37°C. Somministrata fisiologica in infusione continua (n=10);

IPOTERMIA (HT): temperatura mantenuta di 32° - 33°C. Somministrata fisiologica in infusione continua (n=10);

IPOTERMIA FARMACOLOGICA (PH): Infusione continua di WIN 55.212-2 1mg/kg/h (n=10);

- ADENOSINA-LIDOCAINA-MAGNESIO (ALM)

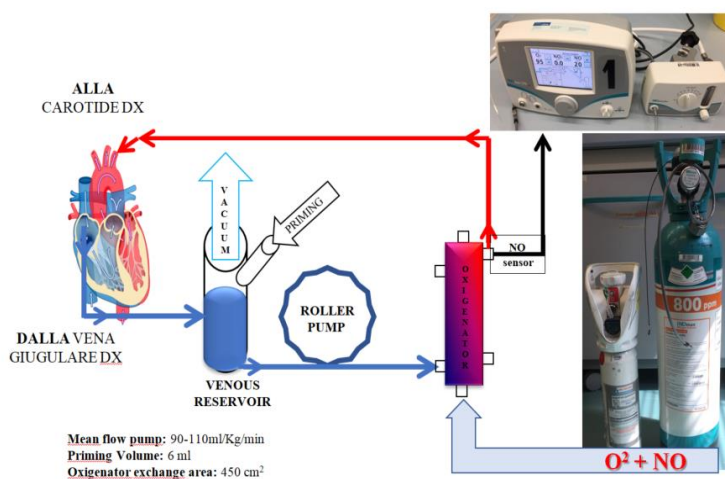


ACC: soluzione fisiologica 1 ml. (n = 10)

ACH: raffreddato a 32°C per 1 ora e soluzione fisiologica 1 ml. (n = 10)

ACALM: soluzione ALM 1 ml (Adenosina 1mM, Lidocaina cloridrato 3 mM, Magnesio solfato 2,5 mM) (n = 10)

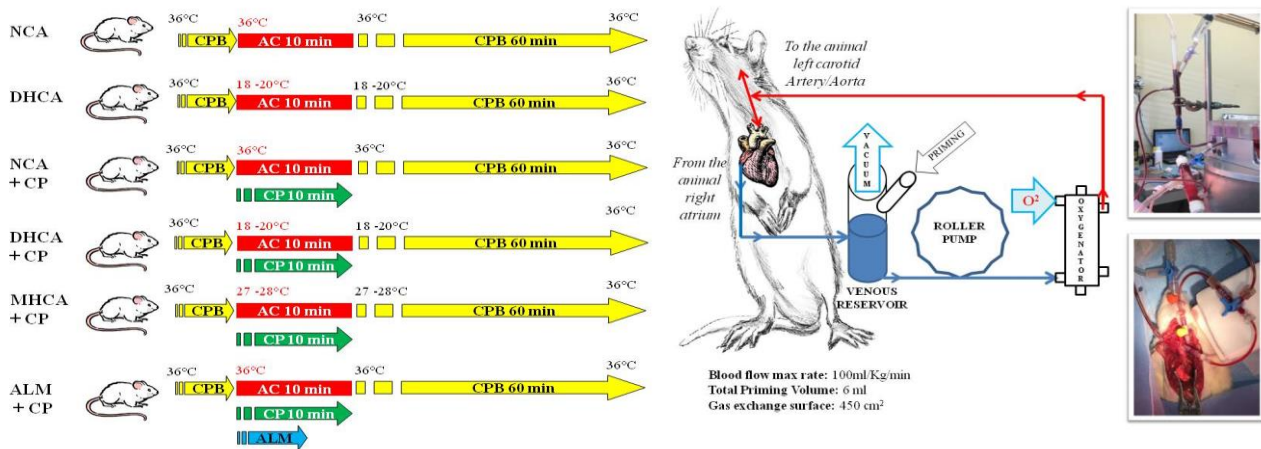
- OSSIDO NITRICO (NO)



ECLS: CPB condotto normalmente in normotermia per 1 ora (n = 15)

ECLS + NO: NO 20 ppm somministrati attraverso ossigenatore per 1 ora (n = 15)

2) ARRESTO DI CIRCOLO E PERFUSIONE CEREBRALE SELETTIVA



NCA arresto di circolo in normotermia (35-36°C) senza perfusione cerebrale (n=10)

DHCA arresto di circolo in ipotermia profonda (18-20°C) senza perfusione cerebrale (n=10)

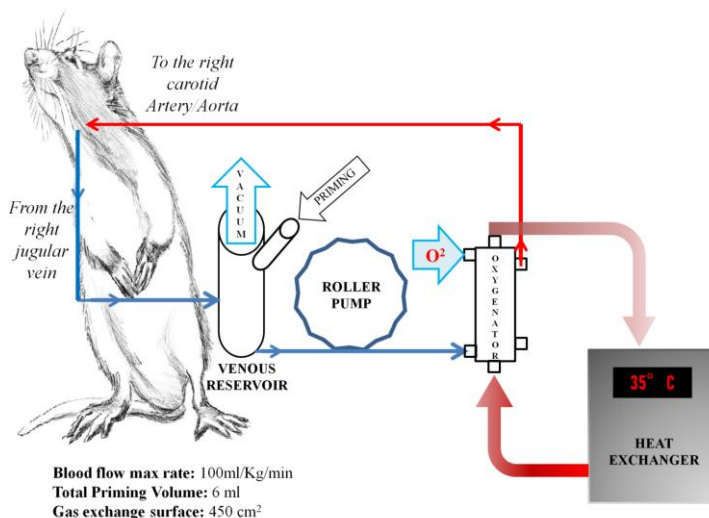
NCA+CP arresto di circolo in normotermia (35-36°C) e perfusione cerebrale (n=10)

DHCA+CP arresto di circolo in ipotermia profonda (18-20°C) e perfusione cerebrale (n=10)

MHCA+CP arresto di circolo in ipotermia moderata (27-28°C) e perfusione cerebrale (n=10)

ALM+CP arresto di circolo in normotermia (35-36°C), perfusione cerebrale e ALM (n=10)

3) IPOTERMIA ACCIDENTALE



SLOW (n=15) raggiunti 35°C in 90 minuti.

FAST (n=15) 35°C in 40 minuti
Mantenuta questa temperatura fino a 90 minuti di riperfusione.